

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Kaspar Matiasek

Angefertigt in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik des
Klinikums Rechts der Isar der Technischen Universität München
(Mentor Priv.-Doz. Dr. med. Güralp Onur Ceyhan)

Die Charakterisierung der neuralen Veränderungen in Lebern mit malignen Lebertumoren und Leberzirrhose

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Stephanie Werscher

aus München

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Tag der Promotion: 12. Juli 2014

Widmung

In Liebe und Dankbarkeit meinem Großvater Erich Werscher gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	8
II	LITERATURÜBERSICHT	10
1	Innervation des Pankreas	10
1.1	Gesundes Pankreas	10
1.2	Chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom	11
1.3	Neurotrophine und deren Rezeptoren	14
1.4	Growth-Associated-Protein-43 (GAP-43).....	16
2	Innervation der Leber.....	17
2.1	Gesunde Leber.....	17
2.2	Lebererkrankungen.....	20
2.2.1	Leberzirrhose.....	20
2.2.2	Hepatozelluläres und Cholangiozelluläres Karzinom	22
3	Ziele der Studie.....	24
III	MATERIAL UND METHODEN	26
1	Patienten.....	26
2	Histologische Methoden.....	28
2.1	Aufarbeitung der Gewebe	28
2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	29
2.3	Immunhistochemie p75NTR, NGF und PGP9.5.....	29
2.4	Immunhistochemie Gap-43	31
2.5	Immunhistochemie TrkA	31
2.6	Auswertung der Färbungen	31
2.6.1	Bestimmung der Anzahl und Größe der Nerven.....	32
2.6.2	Bestimmung der Intensität der Färbung	34
3	Molekularbiologische Methoden.....	36
3.1	Aufarbeitung des Gewebes.....	36
3.2	RNA Isolation aus Lebergewebe.....	36
3.3	Synthese von cDNA	37
3.4	PCR	38
3.5	qRT-PCR.....	40

4	Statistik.....	43
IV	ERGEBNISSE	44
1	Neurale Plastizität	44
1.1	Lokalisation der Nerven	46
1.2	Neurale Hypertrophie	47
1.3	Neurale Dichte.....	48
2	Expressionsanalysen neuraler Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren	49
2.1	GAP-43.....	49
2.1.1	Immunhistochemie	49
2.1.2	qRT-PCR.....	51
2.2	NGF.....	52
2.2.1	Immunhistochemie	52
2.2.2	qRT-PCR.....	54
2.3	TrkA	55
2.3.1	Immunhistochemie	55
2.3.2	qRT-PCR.....	57
2.4	p75 ^{NTR}	58
2.4.1	Immunhistochemie	58
2.4.2	qRT-PCR.....	60
3	Korrelationsanalysen	61
V	DISKUSSION	64
VI	ZUSAMMENFASSUNG	73
VII	SUMMARY.....	75
VIII	LITERATURVERZEICHNIS	77
IX	ANHANG	84
1	Abbildungsverzeichnis	84
2	Tabellenverzeichnis.....	85
3	Materialien.....	85
3.1	Apparaturen.....	85

3.2	Verbrauchsmaterial	87
3.3	Chemikalien	88
3.4	Primer	92
3.5	Antikörper	93
3.5.1	Primär-Antikörper	93
3.5.2	Sekundär-Antikörper	94
3.6	Software	94
X	DANKSAGUNG	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AS	Aminosäure
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
CCC	Cholangiozelluläres Karzinom
cDNA	Complementary DNA
CP	Chronische Pankreatitis
CP-Wert	Crossing Point-Wert
Ct-Wert	Cycle threshold-Wert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRG	Dorsal Root Ganglion
eCCC	Extrahepatisches CCC
ENS	Enterisches Nervensystem
GAP-43	Growth-Associated Protein-43
HBV	Hepatitis B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
iCCC	Intrahepatisches CCC
MAP-Kinase	Mitogen-activated Protein-Kinase
mRNA	Messenger RNA
NGF	Nerve Growth Factor
NO	Stickstoffmonoxid
NT	Neurotrophin
p75 ^{NTR}	p75 Neurotrophin Rezeptor
PCa	Pankreaskarzinom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGP9.5	Protein Gene-Product 9.5
PNS	Peripheres Nervensystem
PSC	Primär Sklerosierende Cholangitis
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
TrkA	Tyrosin-Kinase Rezeptor A

I EINLEITUNG

Das autonome Nervensystem ist der unwillkürliche Teil des peripheren Nervensystems (PNS) und reguliert die Motorik von Eingeweiden, die glatte Muskulatur sowie exokrine Drüsen (Yi, la Fleur et al. 2010). Demnach innerviert es die beiden Anhangsdrüsen des Darms, Leber und Pankreas, die zusätzlich vom enterischen Nervensystem (ENS) versorgt werden (Tiscornia 1977; Salvioli, Bovara et al. 2002; McCuskey 2004).

Humorale und neurale Signale regulieren die Abläufe innerhalb der Leber, die als das zentrale Organ des metabolischen Gleichgewichts des Körpers gilt (Berthoud 2004; Püschel 2004). Die funktionelle Bedeutung der Leberinnervation gilt in diesem Kontext jedoch als unzureichend erforscht (Yi, la Fleur et al. 2010). Zum einen variiert die Verteilung der intrahepatischen Nerven in hohem Maße von Spezies zu Spezies. So haben zum Beispiel Mäuse und Ratten keine oder nur eine gering ausgeprägte intralobuläre Innervation (Lautt 1983; McCuskey 2004; Püschel 2004; Yi, la Fleur et al. 2010). Zum anderen kommt es bei Denervation des Organs nicht zu nennenswerten Abweichungen im metabolischen Gleichgewicht (Püschel 2004). Bei Erkrankungen der Leber wie dem Hepatozellulären Karzinom (HCC), Cholangiozellulären Karzinom (CCC) oder der als präkanzerös anzusehenden Leberzirrhose, kommt es zu bedeutenden Unterschieden in der Innervation der betroffenen Organe. So ist im Vollbild der Leberzirrhose keine parenchymale Innervation mehr nachweisbar und auch das HCC oder das CCC gelten selbst als nicht innerviert (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993; Terada and Matsunaga 2001). Zu einer deutlichen Änderung der Innervation kommt es außerdem beim Pankreaskarzinom (PCa) und der chronischen Pankreatitis (CP), die ebenfalls als Präkanzerose anzusehen ist. In diesem Zusammenhang wird diese Abweichung vom normalen Innervationsmuster mit dem Begriff der „pankreatischen Neuropathie“ zusammengefasst. Dazu gehören neben einer Zunahme der neuronalen Dichte und der neuronalen Hypertrophie auch die pankreatische Neuritis und die neurale Invasion durch Krebszellen (Bockman, Buchler et al. 1988; Ceyhan, Demir et al. 2009). Diese Veränderungen konnten mit einer Reihe trophischer Signale in Verbindung gebracht werden, unter anderem mit dem Growth-Associated-Protein-43 (GAP-43) und dem Nerve growth factor (NGF) mit seine Rezeptoren TrkA

und p75^{NTR} (Zhu, Friess et al. 1999; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Ob sich das Innervationsmuster in der Leber bei den erwähnten Entitäten im selben Maße wandelt wie es im Pankreas beobachtet werden konnte, ist bis zum heutigen Tag noch unzureichend geklärt. Diese Fragestellung soll Bestandteil der vorliegenden Studie sein.

II LITERATURÜBERSICHT

1 Innervation des Pankreas

1.1 Gesundes Pankreas

Die Innervation des Pankreas setzt sich, wie auch die gesamte Innervation des Verdauungstraktes, aus einer intrinsischen und einer extrinsischen Komponente zusammen. Die Vermutung, dass das enterische Nervensystem (ENS) die Anhangsdrüsen des Verdauungssystems (Pankreas und Leber) innerviert, liegt nahe, da diese während der Embryonalentwicklung aus dem Gastrointestinaltrakt (GIT) auswachsen (Kirchgessner and Gershon 1990). Bereits Tiscornia und Poulsen konnten zeigen, dass zwischen Duodenum und Pankreas eine große Anzahl von Nervenfasern verlaufen und dass das Durchtrennen dieser die hormonelle Ausschüttung innerhalb des Pankreas hemmt (Tiscornia 1977; Poulsen, Delikaris et al. 1983). Die meisten dieser Axone im Pankreas enden in Ganglien, einige jedoch auch in der Nähe von Azini, Ausführungsgängen, Blutgefäßen und Inselzellen. So entsteht eine umfangreiche entero-pankreatische Innervation (Kirchgessner and Gershon 1990).

Der intrinsische Bestandteil der Pankreasinnervation wird durch intrapankreatische Ganglien repräsentiert. Diese sind durch Nervenbündel verbunden und physiologische Versuche zeigen, dass sie als intraparenchymale „Schrittmacher“ fungieren, die die endokrine und exokrine Sekretion kontrollieren können (Kirchgessner and Pintar 1991).

Entsprechend gehört die extrinsische Versorgung, bei der Nervenfasern und Zellkörper außerhalb des Verdauungstraktes gelegen sind, zum autonomen Nervensystem mit sympathischen und parasympathischen Afferenzen und Efferenzen. Ihren Ursprung haben diese in splanchnischen Nerven sowie dem Nervus vagus (Tiscornia 1977; Salvioli, Bovara et al. 2002). Die endokrinen Zellen des Pankreas sind spärlich durch dieses Nervensystem innerviert. Nur wenige parasympathische (cholinerge) und sympathische Fasern dringen in die Langerhanschen-Inseln ein und sympathische Fasern ziehen lediglich zu den glatten Muskelzellen der Gefäße innerhalb der Inseln. Sie scheinen somit nicht direkt die endokrine Zellfunktion zu steuern, sondern beeinflussen die

Hormonsekretion durch Kontrolle des Blutflusses (Rodriguez-Diaz, Abdulreda et al. 2011). Gegensätzlich zu der dargestellten Situation beim Menschen verläuft die Innervation der Langerhanschen-Inseln bei der Maus. Im murinen Modell werden beta-, alpha- und delta-Zellen der Inseln durch sympathische und parasympathische Axone innerviert (Rodriguez-Diaz, Abdulreda et al. 2011).

An der Regulation der normalen Pankreasphysiologie, wie Mikrozirkulation, und exokrine/endokrine Sekretion, sind sowohl die intrinsischen als auch die extrinsischen Komponenten der Innervation beteiligt (Salvioli, Bovara et al. 2002).

Zu den Hauptmerkmalen der enterischen und pankreatischen Neuronen gehört die Fähigkeit biologisch aktive Substanzen (z. B. Peptide, Amine) und andere Moleküle (z. B. NO) zu synthetisieren, zu speichern und freizusetzen. Des Weiteren sind einige Neuropeptide in der Lage mit neurotrophen Faktoren (z. B. NGF) zu interagieren, um die Entwicklung verschiedener enterischer und pankreatischer Neurone zu regulieren (Tharakan, Kirchgessner et al. 1995; Salvioli, Bovara et al. 2002).

1.2 Chronische Pankreatitis und Pankreaskarzinom

Die chronische Pankreatitis (CP) wird als fortschreitende inflammatorische Erkrankung definiert, die durch irreversible morphologische Veränderungen, rezidivierende oder persistierende Schmerzen und/oder permanenten Funktionsverlust des Organs charakterisiert ist (Etemad and Whitcomb 2001).

Neben genetischen, umweltbedingten und immunologischen Faktoren, die zur Ausbildung einer CP beitragen, ist langjähriger Alkoholabusus wesentlich an der Krankheitsentstehung beteiligt. Vorrangig sind Männer im Alter zwischen 20 - 50 Jahren betroffen (Ammann 2001; Uomo and Manes 2007).

Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf wird sowohl die exokrine als auch die endokrine Organfunktion stark eingeschränkt bis es nach mehrjährigem Bestehen zu einer Globalinsuffizienz kommt (Ammann and Muellhaupt 1994). Typische Krankheitssymptome sind quälende abdominale Schmerzen, die zu einer deutlichen Minderung der Lebensqualität der Patienten führen (Pezzilli, Morselli

Labate et al. 2005). Als bedeutende therapeutische Maßnahmen gelten Alkoholverzicht und Pankreasschonkost. Darüber hinaus werden die Schmerzen mit zentral wirkenden Analgetika behandelt (Braganza 2011). Einzelne Studien beschreiben zudem eine Schmerzlinderung durch Supplementierung von Pankreasenzymen (Dominques-Munoz 2001).

Das Pankreaskarzinom (PCa) stellt in westlichen Industrienationen die vierthäufigste krebsbedingte Todesursache dar (Vincent, Herman et al. 2011). Die mittlere Überlebensdauer liegt bei ungefähr 6 Monaten (Issa, Nummer et al. 2009).

Bei ca. 90% der primären Pankreastumore handelt es sich um Adenokarzinome des Pankreas (Lenz, Karasek et al. 2011). Zu den Faktoren, die eine Krankheitsentstehung begünstigen, gehören Zigarettenkonsum, Übergewicht sowie Erkrankungen, wie Diabetes mellitus oder Pankreatitis. Letztere gelten in ihrer chronischen Form als Präkanzerose. Auch eine familiäre Vorbelastung erhöht die Wahrscheinlichkeit an einem PCa zu erkranken (Schoppmeyer and Mössner 2003; Vincent, Herman et al. 2011).

Klinisch zeigen sich frühe Stadien des PCa meist symptomlos, was dazu führt, dass die Diagnose oftmals erst in einem fortgeschrittenem Krankheitsstadium gestellt wird (Lenz, Karasek et al. 2011). Zu den Hauptsymptomen gehören neben Gewichtsverlust und Ikterus Rücken- und abdominale Schmerz (Ceyhan, Michalski et al. 2008). Das PCa zeichnet sich des Weiteren durch eine hohe Metastasierungsrate, insbesondere in umliegende Lymphknoten, Leber und Peritoneum aus (Vincent, Herman et al. 2011).

Mithilfe bildgebender Verfahren wie Computer- und Kernspintomographie sowie endoskopischer Ultrasonographie, lässt sich die Diagnose sicher stellen. Letztere Untersuchungsmethode weist in Verbindung mit der Entnahme von Gewebeproben eine Sensitivität von 99% und eine Spezifität von 100% auf (DiMagno, Reber et al. 1999; Vincent, Herman et al. 2011). Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben lediglich 10 – 20% der Patienten chirurgisch resezierbare Tumore. Eine radikale Resektion des Tumors ist allerdings die einzige Möglichkeit einer kurativen Therapie und verlängert bei Nichtresektabilität die Phase der Palliation (Li, Xie et al. 2004; Lenz, Karasek et al. 2011).

Sowohl die chronische Pankreatitis als auch das Pankreaskarzinom sind durch

eine Reihe intrapankreatischer neuropathischer Veränderungen geprägt. Dazu gehören eine erhöhte neurale Dichte und Hypertrophie der Nerven, die pankreatische Neuritis und die neurale Invasion (NI) durch Krebszellen (Ceyhan, Demir et al. 2009). So konnten Ceyhan und Kollegen zeigen, dass die Nervenfläche bei der CP und beim PCa im Vergleich zum normalen Pankreas (NP) um das 8- bzw. 14-fache vergrößert ist und dass die neurale Dichte (Anzahl Nerven pro Quadratmillimeter Gewebefläche) im PCa gefolgt von CP am größten ist. Im Vergleich zur CP sind neurale Dichte und Hypertrophie beim PCa ebenfalls erhöht. Diese Beobachtung erreicht allerdings kein Signifikanzniveau (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). In der CP korreliert der Schweregrad der Fibrosierung mit dem Ausprägungsgrad der neuralen Veränderungen (neurale Hypertrophie, neurale Dichte, Neuritis). So haben Patienten mit milder Fibrose geringere neurale Veränderungen als jene mit schwerwiegender Fibrose (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Die Einengung der pankreatischen Nerven durch die Fibrose scheint allerdings nicht ursächlich für die Entstehung der massiven Schmerzen bei der CP zu sein (Bockman, Buchler et al. 1988). Im PCa konnte kein Zusammenhang zwischen der neuralen Hypertrophie/Dichte bzw. der pankreatischen Neuritis und desmoplastischen Reaktionen hergestellt werden. Diese korrelieren allerdings mit dem Ausprägungsgrad der NI (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Hier sind die Krebszellen nicht auf die Peripherie der Nerven beschränkt, sondern dringen in das Perineurium ein und stehen in enger Verbindung mit Schwann-Zellen und den Axonen im Endoneurium (Bockman, Böhler et al. 1994; Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

Die zuvor beschriebenen neuropathischen Veränderungen stehen nicht in direktem Zusammenhang mit der Überlebenszeit beim PCa. Diese korreliert jedoch mit dem Schweregrad der Schmerzen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

Auch die Qualität der Innervation zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Entitäten. So nimmt der Anteil an sympathischen Nervenfasern pro Nerv im Vergleich zum normalen Pankreas über die CP zum PCa signifikant ab. Ebenso verhält es sich mit dem durchschnittlichen Anteil der sympathischen Innervation an der gesamten Nervenfläche eines Gewebeteils. Der Rückgang der sympathischen Innervation korreliert mit dem Schweregrad der NI und der pankreatischen Neuritis. Demgegenüber zeigt die parasympathische Innervation keine Unterschiede zwischen den einzelnen Entitäten. Diese Veränderungen

unterschieden sich nicht innerhalb unterschiedlicher Ätiologien der CP und verschiedenen PCa-Stadien (Ceyhan, Demir et al. 2009).

Zu guter Letzt bleibt die Frage nach dem Ursprung der „neuen“ intrapankreatischen Nerven bestehen. Sind diese Nerven Äste bereits bestehender Nerven oder wachsen sie aktiv von außen ein? Ebenso verhält es sich mit der neuralen Hypertrophie: Wird diese durch eine Zunahme an Nervenfasern in bereits bestehenden Nerven bedingt? Oder enthalten einwachsende Nerven mehr Nervenfasern? (Ceyhan, Demir et al. 2010). Als mögliche Quellen „neuer“ Nerven gelten Zellkörper innerhalb der DRGs (Dorsal Root Ganglion), des Ganglion inferius nervi vagus oder der intrapankreatischen Ganglien. Ergebnisse der Forschungsgruppe um Takamido geben Hinweise darauf, dass Neurone der DRGs ihre intrapankreatische axonale Synthese steigern und so zu neuralem Wachstum führen. Dieser Vorgang wird bezeichnet als *axonal hyperbranching* (Takamido, Kataoka et al. 2006).

1.3 Neurotrophine und deren Rezeptoren

Parallel zu der Erforschung der in Kapitel 1.2 beschriebenen *pankreatischen Neuropathie* erfolgte die Untersuchung trophischer Signale, die diese nervalen Veränderungen bedingen (Ceyhan, Demir et al. 2010). Zhu und Kollegen gelang der Nachweis erhöhter mRNA-Spiegel von Nerve growth factor (NGF) und dessen Rezeptor TrkA im PCa. Immunhistochemisch konnte NGF vorwiegend im Zytoplasma von PCa Zellen und TrkA im Perineurium pankreatischer Nerven nachgewiesen werden (Zhu, Friess et al. 1999). Des Weiteren gelang Ceyhan und Kollegen der Nachweis erhöhter NGF-Level im PCa und nicht-tumorösem Pankreasgewebe von PCa-Patienten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von NGF mit neuraler Hypertrophie und neuraler Dichte innerhalb des Pankreas korreliert. Entsprechend zeigten Gewebe mit keiner oder nur milder Hypertrophie erhöhte NGF-Spiegel, während in Geweben mit starker Hypertrophie keine oder lediglich geringe NGF-Level detektiert werden konnten (Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Der Nachweis von NGF in PCa-Zellen, TrkA im Perineurium pankreatischer Nerven und NGF zusammen mit TrkA in intrapankreatischen Ganglien bestätigte die Vermutung, dass NGF das

Nervenwachstum sowohl autokrin als auch parakrin stimuliert (Zhu, Friess et al. 1999).

NGF ist das am besten charakterisierte Mitglied der strukturell und funktionell verwandten Familie der Neurotrophine, zu der BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) und die Neurotrophine (NTs) 3,4/5 und 6 gehören. Es ist ein Glykoprotein, bestehend aus 118 Aminosäuren (AS) aufgeteilt in 3 Untereinheiten. NGF bindet die Rezeptoren TrkA und p75^{NTR}, die spezifische und zum Teil voneinander unabhängige zelluläre Funktionen einnehmen (Sofroniew, Howe et al. 2001). Ursprüngliche Beschreibungen des Wachstumsfaktors waren geprägt von dessen Fähigkeit Wachstum, Differenzierung und Überleben von peripheren sensorischen und sympathischen Neuronen während der Entwicklung und nach Verletzung zu stimulieren (Levi-Montalcini 1987). In den letzten Jahren wurde zudem die Rolle des Proteins innerhalb verschiedener Tumorentitäten untersucht. NGF übt sowohl mitogene als auch wachstumshemmende Effekte aus und induziert Zellwachstum und Tumorentität in humanem Prostata-, Brust- und Lungenkrebs (Oelmann, Sreter et al. 1995; Geldof, De Kleijn et al. 1997; Descamps, Lebourhis et al. 1998). Gegensätzlich verhält es sich bei Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Bei dieser Tumorentität unterdrückt NGF die Proliferationsrate der Krebszellen durch Hemmung des klonalen Wachstums und der invasiven Kapazität in Nacktmäusen (Missale, Codignola et al. 1998). Die diesen nahezu gegenteiligen Wirkungen des Wachstumsfaktors zugrundeliegenden Mechanismen gelten als noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings scheinen die NGF-Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} und deren Verhältnis zueinander eine Rolle zu spielen (Oelmann, Sreter et al. 1995; Casaccia-Bonofil, Kong et al. 1998).

TrkA ist ein transmembranes Glykoprotein, das zusammen mit TrkB und TrkC zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen gehört und als *high affinity* Rezeptor für NGF bezeichnet wird (Zhu, Friess et al. 1999; Sofroniew, Howe et al. 2001). Während p75^{NTR} alle NTs mit gleicher Affinität bindet, ist TrkA sehr spezifisch in der Auswahl seiner Bindungspartner (Yoon, Casaccia-Bonofil et al. 1998; Hempstead 2002). Nach Bindung von NGF an TrkA kommt es zu einer Phosphorylierung des Rezeptors am Tyr-490 Tyrosinrest, in dessen Folge das intrazelluläre Protein Shc gebunden wird. Phosphoryliertes Shc aktiviert über verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle die MAP-Kinasen (mitogen-activated

protein) und verursacht somit diverse biologische Effekte (Klesse and Parada 1999; Zhu, Friess et al. 2001). Die Tyrosinkinase-Aktivität und die damit verbundene komplexe Signalweiterleitung macht TrkA zum affineren Rezeptor für NGF (Meakin and Shooter 1992; Sofroniew, Howe et al. 2001).

Verglichen mit TrkA ist die Wirkung des *low-affinity*-NGF-Rezeptors p75^{NTR} in der Weiterleitung von Signalen des Wachstumsfaktors komplexer und weniger genau untersucht (Lee, Kim et al. 2001; Hempstead 2002). Bei p75^{NTR} handelt es sich um ein aus 399 AS bestehendes Typ-1 Transmembranprotein, das sowohl bei der Übermittlung von Überlebens- als auch Apoptosesignalen eine funktionelle Rolle einnimmt (Lee, Kim et al. 2001; Sofroniew, Howe et al. 2001; Hempstead 2002). Die der nahezu gegensätzlichen Wirkungsweise zugrundeliegenden Mechanismen gelten als noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings scheinen Dauer und Stärke der NGF-Wirkung vom Verhältnis TrkA/p75^{NTR} abhängig zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass p75^{NTR} in Anwesenheit von TrkA *high-affinity*-Bindungsstellen ausbildet, was in einer erhöhten Empfindlichkeit für NGF resultiert und wachstumsfördernde Signale verstärkt. In Abwesenheit von TrkA übermittelt p75^{NTR} hingegen insbesondere Signale, die zum Zelltod führen (Oelmann, Sreter et al. 1995; Casaccia-Bonnel, Kong et al. 1998; Twiss, Wada et al. 1998).

1.4 Growth-Associated-Protein-43 (GAP-43)

Growth-Associated-Protein-43 (GAP-43), das auch unter den Namen F1, B-50, Neuromodulin und pp46 bekannt ist, ist ein membranständiges Phosphoprotein, das erstmals in Neuronen nachgewiesen wurde. Es gilt als bewährter Marker für neurale Plastizität während der Entwicklung und nach neuronalen Verletzungen (Verhaagen, Greer et al. 1990; Burry, Lah et al. 1992; Curtis, Stewart et al. 1992; Fink and al. 1994). Das Protein ist beteiligt an der Entwicklung axonaler Wachstumskegel und präsynaptischer Nervenendigungen. Nach neuronalen Verletzungen lassen sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene erhöhte Spiegel nachweisen (Verhaagen, Greer et al. 1990; Coggeshall, Reynodls et al. 1991; Burry, Lah et al. 1992; Chong, Fitzgerald et al. 1992; Booth and Brown 1993). GAP-43 ist ein endogenes Substrat der Proteinkinase C, das dessen

Aktivität durch Phosphorylierung an definierten Serinresten reguliert (Gispen, Nielander et al. 1991; Schaechter and Benowitz 1993; Holahan, Honegger et al. 2007). Es ist weitverbreitet im sich entwickelnden und adulten peripheren und zentralen Nervensystem der Ratte und konnte auch in peripheren Nerven des Menschen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigt das enterische Nervensystem von Säugetieren eine basale GAP-43-Expression (Sharkey, Coggins et al. 1990; Fantini and Johansson 1992; Stewart, Cowen et al. 1992). Ursprünglich ging man davon aus, dass GAP-43 exklusiv von sich entwickelnden pränatalen Neuronen synthetisiert wird, jedoch weisen neuere Erkenntnisse auf eine Beteiligung des Proteins an der strukturellen Plastizität und Neuformation synaptischer Kontakte im adulten Nervensystem hin. Diese Eigenschaft macht es zu einem hervorragendem Werkzeug, um beispielsweise die Plastizität von Nerven im Rahmen der CP zu charakterisieren (Van Lookeren Campagne, Dotti et al. 1992; Fink and al. 1994).

So konnten Veränderungen in der neuronalen Plastizität bei CP und PCa mit einer erhöhten GAP-43-Immunoreaktivität in Verbindung gebracht werden. Diese war besonders ausgeprägt in vergrößerten Nerven (Fink and al. 1994; Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Ceyhan und Kollegen wiesen darüber hinaus nach, dass eine erhöhte neurale Dichte und neurale Hypertrophie bei PCa und PC mit einer Überexpression von GAP-43 korreliert. Untersuchungen mittels Western Blot zeigten bei Patienten mit keiner oder nur milder neuraler Hypertrophie verminderte GAP-43 Level, wohingegen Patienten mit ausgeprägter neuraler Hypertrophie hohe Konzentrationen des Proteins nachgewiesen werden konnten (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010).

2 Innervation der Leber

2.1 Gesunde Leber

Die Leber gilt als das zentrale Organ des metabolischen Gleichgewichts des Körpers. Durch den ernährungsabhängigen Wechsel zwischen Glucoseaufnahme, –speicherung und –freisetzung steuert die Leber den Blutzuckerspiegel. Darüber

hinaus laufen in ihr der Aminosäurestoffwechsel, die Ammoniakentgiftung, der Lipidmetabolismus sowie die letzten Schritte des Purinabbaus ab (Püschel 2004). Humorale und neurale Signale regulieren diese Abläufe (Berthoud 2004). Die funktionelle Bedeutung der Leberinnervation gilt in diesem Kontext jedoch als unzureichend erforscht (Yi, la Fleur et al. 2010).

Das autonome Nervensystem ist der unwillkürliche Teil des peripheren Nervensystems (PNS) und reguliert die Motorik von Eingeweiden, die glatte Muskulatur sowie exokrine Drüsen (Yi, la Fleur et al. 2010). Autonome Nerven, die die Leber innervieren, erreichen das Organ über den Leberhilus und verlaufen gemeinsam mit der Portalvene, der Leberarterie und dem Gallengang (McCuskey 2004). Das autonome Nervensystem umfasst sympathische und parasympathische Nerven, die sowohl afferente als auch efferente aminerge, cholinerge, peptiderge und nitrinerge Komponenten enthalten (McCuskey 2004). Postganglionäre sympathische Nerven stammen von den Eingeweidenerven mit Ursprung im Ganglion coeliacum und Ganglion mesentericum superius, die vom Kerngebiet des Nucleus intermediolateralis des Rückenmarks (T7-T12) innerviert werden (McCuskey 2004; Yi, la Fleur et al. 2010). Demgegenüber haben postganglionäre parasympathische Nerven ihren Ursprung in Ganglien, die im Bereich des Leberhilus und den Portalfeldern lokalisiert sind, welche wiederum präganglionäre Nervenfasern von Ästen des Nervus vagus erhalten (McCuskey 2004).

Die intrahepatische Verteilung dieser Nerven variiert in hohem Maße von Spezies zu Spezies (Lautt 1983). Folglich zeigen Ratten und Mäuse als häufig genutzte Versuchstiere keine oder eine nur gering ausgeprägte intralobuläre Innervation, mit in der Nähe zu der Portalfelder liegenden Nervenenden (McCuskey 2004; Püschel 2004; Yi, la Fleur et al. 2010). Demgegenüber zeigt das Meerschweinchen eine ausgeprägte Innervation mit tief in das Leberparenchym vordringenden adrenergen Nerven, deren Fasern Kontakt mit Hepatozyten und anderen Zellen der Sinusoide haben. Auch bei Mensch, Affe, Katze, Hase, Spitzhörnchen und Taube konnte ein Kontakt von adrenergen Nervenfasern mit Hepatozyten nachgewiesen werden (Forssmann and Ito 1977). Diese Verbindung fehlt bei Ratten, Goldhamster, Amphibien und Fischen. Hier scheint die Signalübertragung über *gap junctions* zu erfolgen, die bei der Ratte in großer Anzahl zwischen benachbarten Hepatozyten nachgewiesen werden

konnten (Lautt 1983; McCuskey 2004). Dementsprechend wird eine inverse Proportionalität zwischen der Präsenz intralobulärer Nerven und *gap junctions* vermutet (McCuskey 2004). *Gap junctions* gelten als permeabel für den sekundären Botenstoff Inositoltriphosphat. Dieser wird nach Aktivierung $\alpha 1$ -adrenerger Rezeptoren von Hepatozyten freigesetzt. Die Vermutung, dass die Signalübertragung bei diesen Spezies über diesen Übertragungsweg erfolgt, wird bestärkt durch die Beobachtung, dass nach Blockierung der *gap junctions* und anschließender Nervenstimulation keine Glucosefreisetzung hervorgerufen wird (McCuskey 2004; Püschel 2004).

Zur funktionellen Charakterisierung der hepatischen Innervation wurden selektive Denervationsstudien durchgeführt. Im Idealfall sollten die sympathische bzw. parasympathische Innervation sowie einzelne Afferenzen und Efferenzen selektiv eliminiert werden (Berthoud 2004). Eine rein hepatische Vagotomie ist jedoch nicht möglich, da der gemeinsame Leberast Teile des distalen Magens, Duodenums und Pankreas versorgt und ein davon abzweigender Ast den Leberhilus umgeht und mit der Arteria gastroduodenalis verläuft. Ebenso schwierig verhält es sich mit der selektiven sympathischen Denervation (Berthoud 2004). Die trotz dieser Problematik durchgeführten Stimulationsstudien kamen zu dem Ergebnis, dass eine Stimulation von zur Leber ziehenden sympathischen Fasern den hepatischen Stoffwechsel stark beeinflusst. Entsprechend wurde die Laktat- und Uratfreisetzung erhöht bzw. die Fettsäureoxidation, VLDL-Synthese, Ketonkörperproduktion, Xenobiotikakonjugation, Gallensäurebildung, Laktataufnahme sowie Aminosäureumsatz und Sauerstoffverbrauch reduziert. Die Stimulation von parasympathischen Nerven führte entsprechend zu einer Erhöhung der basalen und insulin-induzierten Glucoseausschüttung sowie zu einer Hemmung der glucagon-induzierten Glucosefreisetzung (Püschel 2004).

Die Rolle der hepatischen Innervation bei der Steuerung des Leberstoffwechsels wird hingegen weiterhin kontrovers diskutiert, da es im Falle einer Denervation durch chirurgisches oder pharmakologisches Eingreifen keine nennenswerten Abweichungen im metabolischen Gleichgewicht nachweisbar sind. (Püschel 2004). Entsprechend kommt es bei lebertransplantierten Patienten zu keinen lebensbedrohlichen Stoffwechselentgleisungen, obwohl in der Regel mehrere Monate post transplantationem keine Re-innervation festzustellen ist. Lebertransplantierte Patienten zeigen einen normalen insulin-abhängigen

Glucosestoffwechsel und nach Erholung von den initialen Effekten der immunsuppressiven Therapie einen weitgehend unveränderten Protein- und Fettsäuremetabolismus (Yi, la Fleur et al. 2010).

Zusammengefasst ist davon auszugehen, dass die direkte efferente Innervation der Leber nicht entscheidend an der Steuerung des Glucose-, Aminosäure- und Fettstoffwechsel beteiligt ist, sondern vielmehr Autoregulationsmechanismen innerhalb der Leber in der Lage sind, den Metabolismus in Ruhesituationen zu kontrollieren (Yi, la Fleur et al. 2010). Die autonome Innervation scheint vielmehr in „fight or flight“-Situationen eine Rolle zu spielen. Darüber hinaus ist die Feinabstimmung durch die direkte efferente Innervation bei der Entstehung pathologischer Zustände im Rahmen metabolischer Erkrankungen von Bedeutung (Püschel 2004; Yi, la Fleur et al. 2010).

2.2 Lebererkrankungen

2.2.1 Leberzirrhose

Die Leberzirrhose wird definiert als diffuser Prozess, der durch Fibrose und Umwandlung der normalen Leberarchitektur in strukturell abnormale Knoten charakterisiert ist (Friedmann, S. et al. 2012). Sie stellt das Endstadium diverser chronischer Lebererkrankungen und somit ein erhebliches Gesundheitsproblem dar (Okuda 2007; Chandok and Watt 2010). Studien gehen davon aus, dass 4.5-9.5% der Weltbevölkerung von dieser Erkrankung betroffen sind und jährlich schätzungsweise 770.000 Menschen an ihren Folgen sterben (Chandok and Watt 2010). Hauptursächlich für ihre Entstehung sind Alkoholmissbrauch sowie chronische Hepatitis-B-Virus- (HBV) und Hepatitis-C-Virus- (HCV) -Infektionen (Michelli 2011).

Zu den typischen Symptomen der Leberzirrhose gehören Ermüdung, Unwohlsein, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Ikterus und Aszites (Okuda 2007). Im Blutbild betroffener Patienten zeigen sich Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie. Daneben lassen sich eine Verlängerung der Gerinnungszeit und eine Erhöhung der Aktivität der Leberenzyme feststellen (Friedmann, S. et al. 2012). Mögliche Komplikationen dieser Erkrankung sind unter anderem Sepsis, bakterielle Peritonitis, portale Hypertension, damit einhergehende Blutungen der

entstehenden Ösophagusvarizen und die Hepatokarzinogenese (Michelli 2011).

Je nach Ätiologie der Leberzirrhose stehen verschiedene Therapieansätze zur Verfügung. Vordergründig ist die symptomatische Therapie der sich einstellenden Komplikationen, da die Erkrankung an sich nicht heilbar ist (Michelli 2011). Im Endstadium kann in Einzelfällen eine Lebertransplantation als ultima ratio erwogen werden (Friedmann, S. et al. 2012).

Unabhängig von der der Zirrhose zugrundeliegenden Ursache finden sich im Vergleich zu gesunden Organen bedeutende Unterschiede in der Innervation betroffener Lebern. Bereits prä-zirrotische Stadien chronischer Lebererkrankungen weisen eine Reduktion in der Anzahl parenchymaler Nerven auf (Lee, Ahmed et al. 1992). Noch deutlicher wandelt sich das Innervationsmuster im Vollbild der Leberzirrhose. Entsprechend lassen sich in Regeneratknoten keine Nervenfasern mehr nachweisen (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993). Lee und Kollegen konnten allerdings zwischen den Knoten innerhalb fibröser Septen Nerven von deutlicher Ausprägung nachweisen (Lee, Ahmed et al. 1992). Der dem Rückgang zugrunde liegende Mechanismus konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Es wird jedoch vermutet, dass die Degeneration des Nervengewebes im Entstehungsprozess der Leberzirrhose Teil des primären Leberschadens ist (Miyazawa, Fukuda et al. 1988). Demgegenüber steht die Tatsache, dass akut erkrankte Organe eine weitgehend normale parenchymale Innervation aufweisen, die in Dichte und Verteilungsmuster nicht von der normaler Lebern zu unterscheiden ist (Lee, Ahmed et al. 1992). Dies führte zu der Hypothese, dass der Rückgang der parenchymalen Innervation zum einen durch eine abnormale Wachstumsart, zum anderen durch die progressive Zerstörung der Struktur der Portalfelder, in denen sich die meisten Nerven befinden, bedingt ist (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993). Darüber hinaus scheint es ausreichend Wachstumsfaktoren zu geben, die die Proliferation von Hepatozyten und sinusoidalen Zellen fördern, jedoch keine, die das Einwachsen von Nerven in die Regeneratknoten stimulieren (Lee, Ahmed et al. 1992). Ebenfalls noch ungeklärt sind die Konsequenzen, die die parenchymale Denervation für diese Organe hat. Entsprechend scheinen die Beeinträchtigungen der intrahepatischen Blutversorgung und des intrahepatischen Stoffwechsels bei Patienten mit Leberzirrhose Folgen dieser Entwicklung zu sein (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993).

2.2.2 Hepatozelluläres und Cholangiozelluläres Karzinom

Mit einem Anteil von 85 – 90% ist das Hepatozelluläres Karzinom (HCC) die am stärksten vertretene Entität der primär malignen Lebertumoren (El-Serag and Rudolph 2007). Weltweit ist das Auftreten des HCCs nicht gleichmäßig verteilt, die meisten Fälle (>80%) treten in Afrika und Ostasien auf. In diesen Regionen liegt die Inzidenz bei ungefähr >20/100.000 Menschen, während in Nordeuropa die Inzidenz bei ca. <5/100.000 Menschen beziffert wird. Erklären lässt sich diese ungleiche Verteilung mit der unterschiedlichen Prävalenz bekannter Risikofaktoren wie zum Beispiel der HBV-Infektion (El-Serag and Rudolph 2007). Zu den weiteren Risikofaktoren für die Entstehung eines HCCs gehören Infektionen mit HCV, Aflatoxine, Alkohol- und Zigarettenkonsum, Adipositas, Diabetes mellitus sowie orale Kontrazeptiva (Chuang, La Vecchia et al. 2009).

Klinisch zeigen betroffene Patienten vor allem eine abdominelle Schmerzsymptomatik, Unwohlsein und Gewichtsverlust. Einige sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jedoch symptomlos. Oft wird das HCC von einer Reihe paraneoplastischer Symptome wie Hypoglykämie, Erythrozytose, Hypercholesterinämie und einer Erhöhung weiblicher Geschlechtshormone begleitet (Friedmann, S. et al. 2012). Als tragende Säulen der Diagnosestellung gelten ultrasonographische Untersuchungen sowie andere bildgebende Verfahren, wie die Magnetresonanztomographie und die Computertomographie (Friedmann, S. et al. 2012).

Da die Diagnose meist in einem späten Stadium der Erkrankung gestellt wird und häufig eine Leberzirrhose zugrunde liegt, kommt nur bei ca. 12% der Patienten eine potentiell kurative Therapie infrage. Hierzu gehören die Resektion sowie die Lebertransplantation, die das 1-Jahres- bzw. 3-Jahres-Überleben auf 70% bzw. 55% erhöhen (El-Serag 2004). Neben Chemotherapie und Radiotherapie, die in ihrer Anwendung beim HCC häufig limitiert oder ineffektiv sind, gibt es gezielte molekulare Therapien, wie beispielsweise Sorafenib (Multikinase-Inhibitor), die allerdings einen palliativen Ansatz verfolgen (Kakar and Ferrell 2011; Aravalli, Cressman et al. 2012; Friedmann, S. et al. 2012). Einen ebenfalls lebensverlängernden Effekt verspricht die sogenannte TACE-Therapie (transarterielle Chemoembolisation) bei inoperablen HCC-Varianten (Oliveri, Wetterslev et al. 2011).

Die zweihäufigste Form des primären Leberkrebses ist das Cholangiozelluläre

Karzinom (CCC). Es macht weltweit ungefähr 3% der gastrointestinalen Krebserkrankungen aus und seine Inzidenz liegt über den Globus verteilt bei ca. 0.2-2/100.000 Menschen (Chuang, La Vecchia et al. 2009). CCCs sind aggressive, maligne Tumoren, die ihren Ursprung im Gallengangssystem haben und wie das HCC epithelialer Herkunft sind. Man unterscheidet phänotypisch die intrahepatische (iCCC) von einer extrahepatischen (eCCC) Form (Palmer and Patel 2012). Neben bekannten Risikofaktoren wie die Primär Sklerosierende Cholangitis (PSC), Gallensteinleiden, Toxine (z. B. Thorotrast) und Infektionen mit Leberegel, gehören HBV- bzw. HCV-Infektionen, Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Alkoholkonsum zu den Faktoren, die in Zusammenhang mit der CCC-Entwicklung stehen (Chuang, La Vecchia et al. 2009; Palmer and Patel 2012).

Zur Diagnose der extrahepatischen Form eignet sich eine Nadelbiopsie, während sich die Diagnose der intrahepatischen Form schwieriger gestaltet. ECCCs sind, ebenso wie kleinere intrahepatische Formen meist resezierbar, allerdings ist die Rezidivrate bei beiden Formen trotz chirurgischer Entfernung hoch und die Prognose entsprechend schlecht (Friedmann, S. et al. 2012). So liegen die 1- bzw. 2-Jahres-Überlebensraten bei lediglich 25% bzw. 13% (Kumar, Abbas et al. 2009).

Ähnlich wie bei der Leberzirrhose kommt es beim HCC und iCCC zu deutlichen Veränderungen der intrahepatischen Innervation (Terada and Matsunaga 2001). In HCCs konnten innerhalb tumoröser Sinusoide keine Nervenfasern nachgewiesen werden, allerdings wurde Nervengewebe in der Umgebung von Blutgefäßen in der Tumorkapsel und in Portalfeldern in invasiven Tumorgebieten gefunden. Keine Nerven fanden sich in neu-gebildeten Blutgefäßen des Tumors (Terada and Matsunaga 2001). Im Gegensatz dazu ließen sich im iCCC gelegentlich Nervenfasern im Tumorstroma nachweisen. Der Ursprung dieser Nervenfasern ist unklar, denkbar ist allerdings, dass es sich um Reste der Innervation bereits vor der Tumorentstehung existierender Portalfelder handelt, die vom Tumor eingeschlossen wurden. Da sie nur in sehr geringer Dichte vorkommen, gilt es als unwahrscheinlich, dass sie Blutfluss und Metabolismus des Tumors beeinflussen (Terada and Matsunaga 2001).

Sowohl im HCC als auch im iCCC fanden sich Nerven in Portalfeldern der nicht-tumorösen Region. Da auch im reichlich durchbluteten HCC keine Nerven an den

Blutgefäßen des Tumors nachgewiesen werden konnten, scheint der Einfluss dieser neuralen Strukturen auf Mikrozirkulation und Metabolismus von HCC und iCCC gering zu sein (Terada and Matsunaga 2001).

Zusammenfassend lässt sich beurteilen, dass weder HCC noch iCCC selbst innerviert sind (Terada and Matsunaga 2001).

3 Ziele der Studie

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es relativ wenige Studien, die sich mit der Rolle des autonomen Nervensystems bei viszerale Neoplasien beschäftigt haben (Ceyhan, Demir et al. 2009). Ein Organ, das in diesem Zusammenhang verhältnismäßig gut untersucht ist, ist das Pankreas. Hier konnten Forscher bei der CP und dem PCa im Vergleich zum NP umfangreiche Veränderungen der Innervation feststellen, die als „pankreatische Neuropathie“ zusammengefasst werden können (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Demir et al. 2009). Hierzu gehören eine Zunahme der neuralen Dichte, die neurale Hypertrophie, die pankreatische Neuritis und die neurale Invasion (Bockman, Buchler et al. 1988; Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Ceyhan und Kollegen konnten zeigen, dass die Veränderungen der Nervenmorphologie und der –plastizität im Rahmen der CP und des PCa bedingen und somit die „pankreatische Neuropathie“ begründen (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Zu den bereits identifizierten Faktoren gehören unter anderem NGF, GAP-43 und Artemin (Ceyhan, Bergmann et al. 2007; Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Darüber hinaus vermuten die Forscher, dass es sich bei der Umgestaltung der intrapankreatischen Nerven im Rahmen der CP und dem PCa nicht nur um eine Begleiterscheinung dieser Erkrankungen, sondern um eine angepasste und einheitliche Antwort des Nervensystems auf Entzündung und Krebsbiologie im Gastrointestinaltrakt handelt (Ceyhan, Demir et al. 2009).

Unter diesen Gesichtspunkten ist die Leber als zweite Darmanhangsdrüse neben dem Pankreas in das Zentrum des Interesses zahlreicher Forschungsarbeiten gerückt. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist allerdings noch nicht untersucht worden, ob es auch in diesem Organ das Bild einer „hepatischen Neuropathie“ gibt.

Demnach ist ein Ziel dieser Arbeit zu zeigen, ob es bei der Leberzirrhose als Präkanzerose und den häufigsten primären Lebertumoren HCC und CCC zu möglichen Veränderungen der intrahepatischen Innervation kommt. Studien, die sich bisher mit Nerven innerhalb der genannten Entitäten befasst hatten, konnten lediglich zeigen, dass es bei der Leberzirrhose, dem HCC und dem CCC zu einer deutlichen Abnahme der parenchymalen Innervation kommt. So konnten innerhalb der Regeneratknoten in der Leberzirrhose und innerhalb des HCCs keine Nervenfasern nachgewiesen werden. Lediglich innerhalb des CCCs fanden sich einige wenige Nervenfasern (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993; Terada and Matsunaga 2001). Lee und Kollegen wiesen zwischen den Regeneratknoten innerhalb fibröser Septen Nerven deutlicher Ausprägung nach, ohne jedoch eine genaue Bestimmung der Nervengröße durchzuführen (Lee, Ahmed et al. 1992). Der Begriff der „neuralen Hypertrophie“ wurde in diesem Zusammenhang daher nicht verwendet. Die Bestimmung der Nervengröße und der neuralen Dichte unter der Verwendung des Proteins PGP9.5 (Protein Gene-Product) ist somit weiterer Bestandteil der vorliegenden Arbeit (Lee, Ahmed et al. 1992).

Basierend auf den Ergebnissen der Pankreasforschung ist es darüber hinaus Ziel der vorliegenden Arbeit mögliche Wachstumsfaktoren, die eine Veränderung der Innervation der Leber bei den genannten Entitäten bedingen könnten, zu identifizieren. Die bereits im Pankreas mit der Neuropathie in Verbindung gebrachten Faktoren GAP-43 und NGF mit den Rezeptoren TrkA und p75^{NTR}, sind aus diesem Grund Bestandteil unserer Untersuchungen.

III MATERIAL UND METHODEN

1 Patienten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Lebergewebeproben wurden im Rahmen operativer Eingriffe entnommen. Ein positives Ethikvotum sowie die schriftliche Einwilligung der Patienten lagen zum Zeitpunkt der operativen Eingriffe vor. Das aus insgesamt 103 Patienten bestehende Kollektiv setzt sich wie folgt zusammen:

- 22 Patienten mit normalem Lebergewebe, davon 9 weibliche Patientinnen und 13 männliche Patienten. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 62 Jahren. Hierbei handelt es sich um Patienten mit Lebermetastasen anderer Tumorentitäten (Rektumkarzinom, Kolorektales Karzinom, Ovarialkarzinom). Ausgeschlossen wurden Patienten mit nicht therapierbarem Primarius, Metastasen in weiteren Organen sowie weiteren pathologischen Auffälligkeiten bzw. Abweichungen der Leber von einer normalen Morphologie (z. B. Steatosis hepatis).
- 23 Patienten mit Leberzirrhose, davon 7 weibliche Patientinnen und 16 männliche Patienten. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 52 Jahren. Hierbei handelt es sich um Patienten mit dem Vollbild einer Leberzirrhose ohne Nachweis eines HCC bzw. CCC.
- 45 Patienten mit einem HCC, davon 13 weibliche Patientinnen und 32 männliche Patienten. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 60 Jahren. Tabelle 1 gibt die Prävalenz der einzelnen Tumorstadien im präoperativen Staging wieder.
- 13 Patienten mit einem iCCC, davon 6 weibliche Patientinnen und 7 männliche Patienten. Das Durchschnittsalter dieser Gruppe lag bei 73 Jahren. . Tabelle 2 gibt die Prävalenz der einzelnen Tumorstadien im präoperativen Staging wieder.

Tabelle 1: HCCs: Prävalenz der einzelnen Tumorstadien im präoperativen Staging.

	Patienten	Gesamt	Weiblich	Männlich
	Ø Alter	60	58	61
	Anzahl	45	13	32
T	T1	9	5	4
	T2	15	6	9
	T3	20	2	18
	T4	1	0	1
N	N0	14	5	9
	NX	31	8	23
M	MX	45	13	32
	G1	2	0	2
	G2	25	7	18
	G2-3	2	1	1
	G3	12	3	9
	G3-4	1	0	1
	GX	3	2	1

Tabelle 2: CCCs: Prävalenz der einzelnen Tumorstadien im präoperativen Staging.

	Patienten	Gesamt	Weiblich	Männlich
	Ø Alter	73	73	73
	Anzahl	13	6	7
T	T1	7	5	2
	T2	2	0	2
	T3	4	1	3
N	N0	5	4	1
	NX	8	2	6
M	MX	13	6	7
G	G2	8	4	4
	G3	5	2	3

2 Histologische Methoden

2.1 Aufarbeitung der Gewebe

Das für diese Arbeit benötigte Lebergewebe wurde direkt nach Erhalt aus dem Operationssaal in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Dulbecco's PBS (1x); PAA-Laboratories; Pasching, Österreich) verbracht. Nach dem Zuschnitt wurde es für 24 Stunden in 4 % Paraformaldehyd (Paraformaldehyd-Lösung 8%; Apotheke Klinikum Rechts der Isar; München, Deutschland) fixiert. Nachdem es für weitere 24 Stunden in 70 % Ethanol Apotheke Klinikum Rechts der Isar; München, Deutschland) ausgewaschen wurde, wurde es im Gewebeeinfiltrationsautomat über Nacht durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und paraffiniert. Anschließend folgte die Einbettung in Paraffin (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland).

Von diesen Gewebestücken wurden nun 3 µm dicke Schnitte mit dem Rotationsmikrotom angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgezogen und

für 24 Stunden in den Wärmeschrank verbracht.

Zu Beginn der Färbungen wurden die Paraffinschnitte jeweils in Roticlear (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Standardfärbung in der Histologie. In der vorliegenden Arbeit diente diese Färbung der Charakterisierung der Gewebe, um sicherzustellen, dass nur histologisch geeignetes Gewebe in der Studie untersucht wurde.

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten wurden zunächst für 30 Sekunden in Hämatoxylin (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden sie in Leitungswasser geschwenkt und für 15 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt.

Nach Inkubation der Proben für ungefähr 5 Sekunden in Eosin (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland), wurden sie kurz mit destilliertem Wasser abgespült und für wenige Sekunden in 70-% Ethanol geschwenkt. Abschließend wurden die Gewebestücke nochmals für 30 Sekunden in 96-% Ethanol behandelt und nach Verwendung von Roticlear (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) mittels Roti-Mount (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) fixiert.

2.3 Immunhistochemie p75^{NTR}, NGF und PGP9.5

Nach zwei Waschgängen in 1xTBST wurden die Schnitte für fünf Minuten bei Raumtemperatur mit 0.5-% Triton X-100 (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) behandelt. Dies dient der Permeabilisierung der Zellen und erhöht damit die Effektivität der Antikörper. Im Anschluss an einen erneuten Waschschrift wurden die Gewebeschnitte für fünf Minuten in 3-%igem Wasserstoffperoxid (Wasserstoffperoxid 30%, 1000 ml; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) inkubiert, um gewebeeigene Peroxidasen zu sättigen.

Bevor die Proben mit 10-%igem normalem Ziegenserum (Normal Goat Serum 10% ready to use; Invitrogen; Carlsbad, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt wurden, war ein weiterer fünfminütiger Waschschriff mit destilliertem Wasser notwendig.

Im Anschluss wurden die Antikörper (Polyclonal Rabbit Anti-PGP 9.5, 1,0g/l, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:2000; NGF Antibody (H-20): sc-548, 200µl, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, Verdünnung 1:100; Monoclonal Anti-Nerve Growth Factor Receptor (NGFR p75), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland, Verdünnung 1:20.000) auf die Gewebeproben aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Negativkontrollen bei diesem Versuch dienten doppelt vorhandene Gewebeschnitte, die anstelle des Antikörpers mit Dako N-Universal Negative Control Rabbit/Mouse (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland) behandelt und ebenfalls bei 4°C über Nacht inkubiert wurden.

Am Folgetag wurde nach dreimaligem jeweils zehnminütigem Waschen mit 1xTBST der Zweitantikörper (Dako Envision + system HRP Labelled Polymer, Anti-Rabbit/Anti-Mouse; Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland) aufgetragen. Dieser wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluss an einen erneuten Waschschriff in 1xTBST folgte die Färbereaktion unter Verwendung des Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen Systems (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland). Unter visueller Kontrolle mittels Durchlichtmikroskopie wurde die optimale Dauer der Färbereaktion auf zwei Minuten (PGP9.5), 40 Sekunden (P75^{NTR}) bzw. 10 Minuten (NGF) festgelegt bevor diese in destilliertem Wasser gestoppt wurde.

Die mit PGP9.5 gefärbten Objektträger wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dazu wurden diese für ungefähr zehn Sekunden in dem Farbstoff geschwenkt und für 15 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt.

Abschließend wurden die Gewebestücke nach Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe und Roticlear mithilfe von Roti-Mount fixiert.

2.4 Immunhistochemie Gap-43

Die Gewebeschnitte wurden nach zwei Waschschritten mit 1xTBST zunächst für zweimal fünf Minuten in 1xCitratpuffer in der Mikrowelle gekocht. Nachdem die Proben für ungefähr 20 Minuten abkühlten und ein weiteres Mal in 1xTBST gewaschen wurden, gleicht das weitere Protokoll dem in Abschnitt 1.2.3 beschriebenen. Als Antikörper wurde Anti-Growth Associated Protein 43 Antibody MAB347 (50µg; EMD Millipore Corporation; Billerica, MA, USA) verwendet.

2.5 Immunhistochemie TrkA

Das Protokoll für diese Färbung gleicht bis zum Arbeitsschritt des Proteinblocks dem der GAP-43-Immunhistochemie. Anstelle des 10-%igen normalen Ziegenserums wurde für diese Färbung das Blocking Serum aus dem Vectastain® ABC Kit (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA) verwendet und für eine Stunde auf den Gewebeschnitten belassen. Anschließend wurde der Antikörper (TrkA (14G6) Rabbit mAb; Cell Signaling Technology, Inc.; Danvers, USA) in einer 1:400 fachen Verdünnung aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit 1xTBST wurde für 45 Minuten der biotinylierte Zweitantikörper, ebenfalls aus dem Vectastain® ABC Kit, auf die Objektträger aufgebracht, bevor für weitere 45 Minuten die Vectastain® *Elite* Reagenz bestehend aus Avidin und biotinylierter Meerrettich Peroxidase (Vectastain® ABC Kit) inkubiert wurde.

Im Anschluss an dreimaliges Waschen mit 1xTBST gleicht das weitere Protokoll dem in Kapitel 1.2.3 beschriebenen.

2.6 Auswertung der Färbungen

In dieser Arbeit wurde Lebergewebe von 23 Patienten mit Leberzirrhose, 45 Patienten mit einem HCC und 13 Patienten mit einem CCC für die Färbungen verwendet. Als Kontrollgruppe diente gesundes Lebergewebe von 22 Patienten.

Alle Gewebeschnitte wurden zunächst HE gefärbt, um sicherzustellen, dass die Zuordnung in die einzelnen Gruppen histologisch korrekt erfolgte.

2.6.1 Bestimmung der Anzahl und Größe der Nerven

Für diese Auswertung wurden die Gewebeschnitte, die mit dem PGP9.5-Antikörper gefärbt worden waren, verwendet. Auf jedem Gewebestück wurden zunächst alle Nerven, die unter dem Mikroskop sichtbar waren, aufgenommen. Die so entstandenen Bilder wurden dann mithilfe der ImageJ Software (National Institutes of Health) ausgewertet.

Im ersten Schritt wurde das Originalbild mittels ImageJ geöffnet (Abb.1 A). Um die Größe der darauf sichtbaren Nerven genau bestimmen zu können, war es notwendig das Bild neu zu kalibrieren. Dazu wurde der sich auf der Aufnahme befindliche Maßstab mit dem Werkzeug „straight“ markiert und die bekannte Länge (z.B. 100µm) mithilfe der Funktion „set scale“ eingetragen (Abb.1 B). Nachdem der gewünschte Messparameter (hier: Fläche) festgelegt worden war (Abb.1 C), wurde der gesamte Nerv mit dem Tool „freehand selections“ möglichst genau mit dem Cursor umfahren (Abb.1 D). Hierdurch wurde der zu messende Bereich festgelegt. Die Nervenfläche in µm² konnte auf diese Weise genau ermittelt werden.

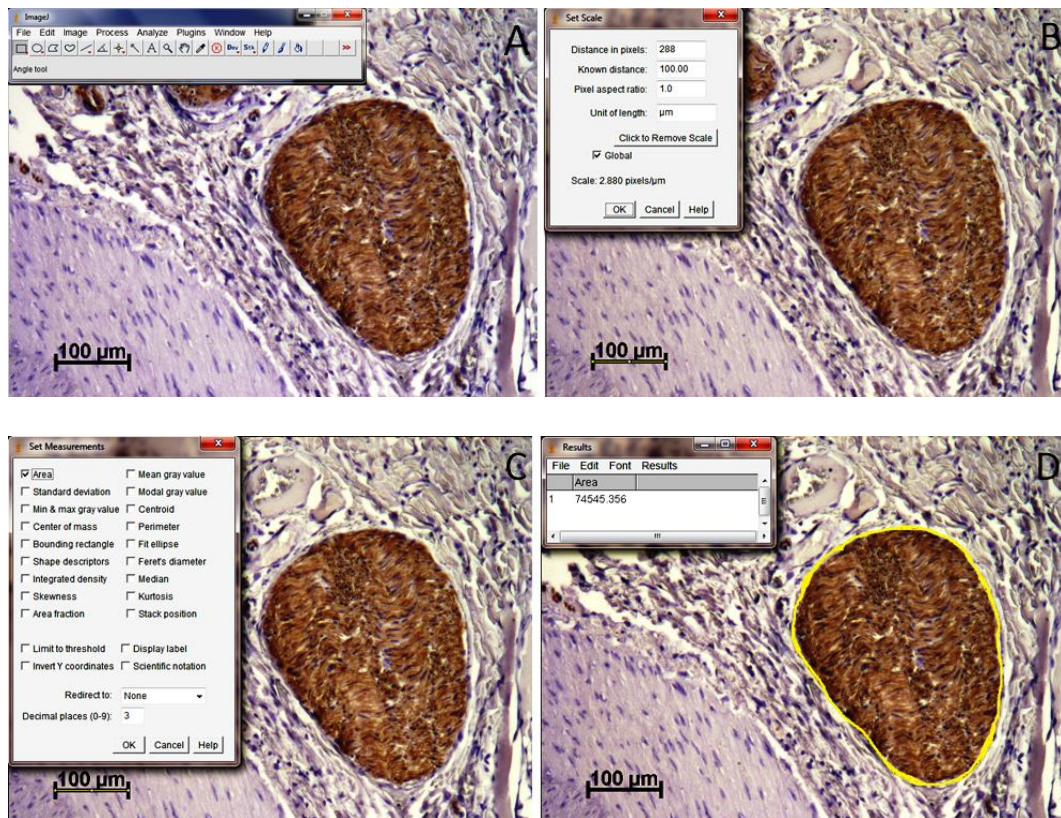


Abbildung 1: Computergestützte Auswertung (ImageJ) der Nervenfläche am Beispiel eines mit PGP9.5 gefärbten HCC-Schnittes; A: Originalbild; B: Einstellung der Skala; C: Festlegung des Messparameters; D: Festlegung des zu messenden Bereichs und Ergebnis

Um die Gesamtnervenflächen einzelner Patienten miteinander vergleichen zu können, wurde es außerdem notwendig die Gesamtfläche der einzelnen Gewebestücke zu bestimmen. Dazu wurden die Objektträger mithilfe des Nikon-Scanners aufgenommen und ebenfalls mittels ImageJ vermessen. Hierbei war es von Bedeutung, nach durchgeführter Messung der Gewebefläche eventuell vorhandene Lücken zu subtrahieren.

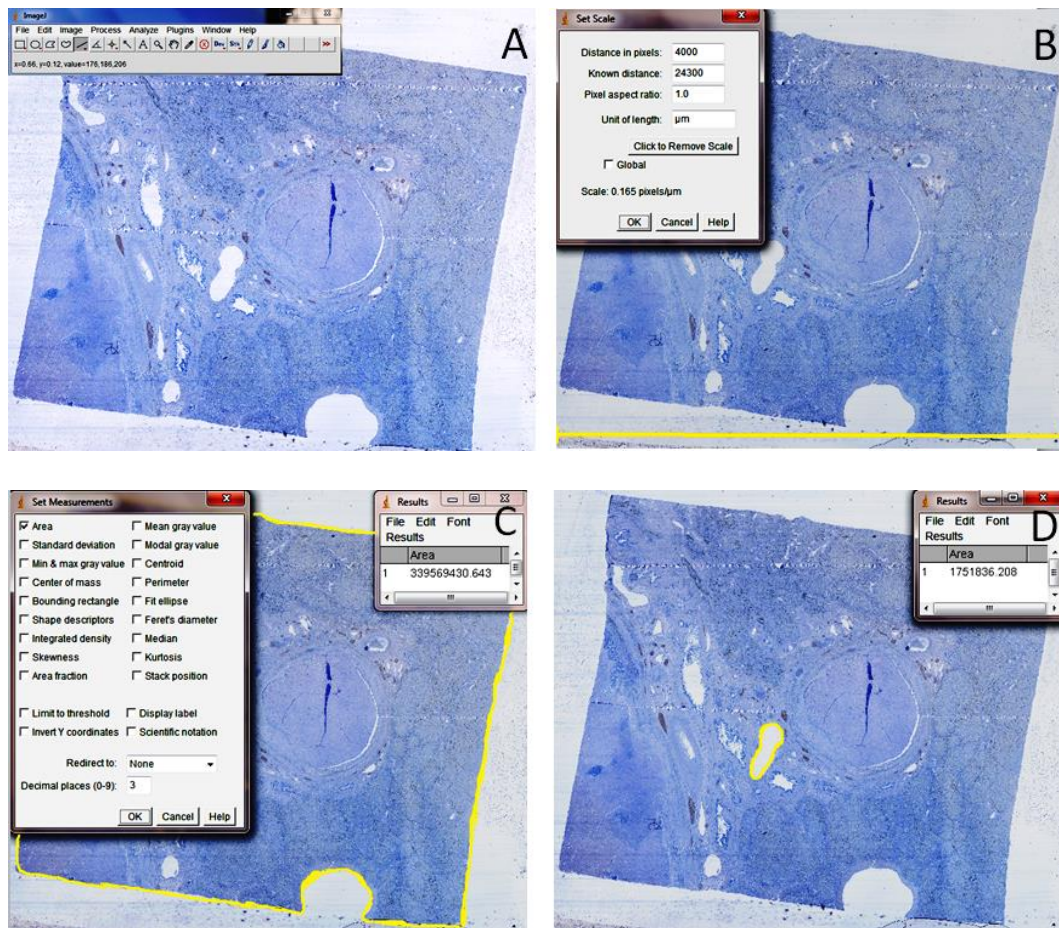


Abbildung 2: Computergestützte Auswertung (ImageJ) der Gewebefläche am Beispiel eines mit PGP9.5 gefärbten HCC-Schnittes; A: Originalbild; B: Einstellung der Skala; C: Festlegung des Messparameters und des zu messenden Bereichs mit Ergebnis; D: Messung einer zur subtrahierenden Lücke

2.6.2 Bestimmung der Intensität der Färbung

Diese Auswertung wurde an allen mit GAP-43, NGF, p75NTR und TrkA immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten durchgeführt. Hierfür wurden ebenfalls alle unter dem Mikroskop sichtbaren Nerven aufgenommen und die Bilder mithilfe der ImageJ Software ausgewertet. In diesem Zusammenhang musste das Ausmaß der Farbtintensität (immunoreaktiver Bereich) ermittelt werden.

Nachdem das Originalbild mittels ImageJ geöffnet wurde (Abb.3 A), konnte dieses zusätzlich zur Einstellung der Skala und der Messparameter (hier: Area und Area fraction) in einen 8-bit Modus konvertiert werden (Abb.3 B). Im nächsten Schritt wurde der Schwellenwert, der ausschließlich den immunreaktiven Bereich markierte, mit der Funktion „threshold“ festgelegt (Abb.3 C). Nachdem der zu messende Nerv wiederum von Hand genau umfahren worden war, konnte

zusätzlich zur Fläche in μm^2 auch der prozentuale Anteil des immunreaktiven Bereichs gemessen werden (Abb.3 D).

Alle Gewebeproben wurden auf diese Art und Weise vermessen. Für die einzelnen Patienten wurden aus der Vielzahl der immunreaktitäten Nerven Mittelwerte errechnet, die wiederum innerhalb der verschiedenen Entitäten zusammengefasst wurden. So konnte die Immunreaktivität eines Faktors in den Nerven bei den verschiedenen Entitäten miteinander verglichen werden.

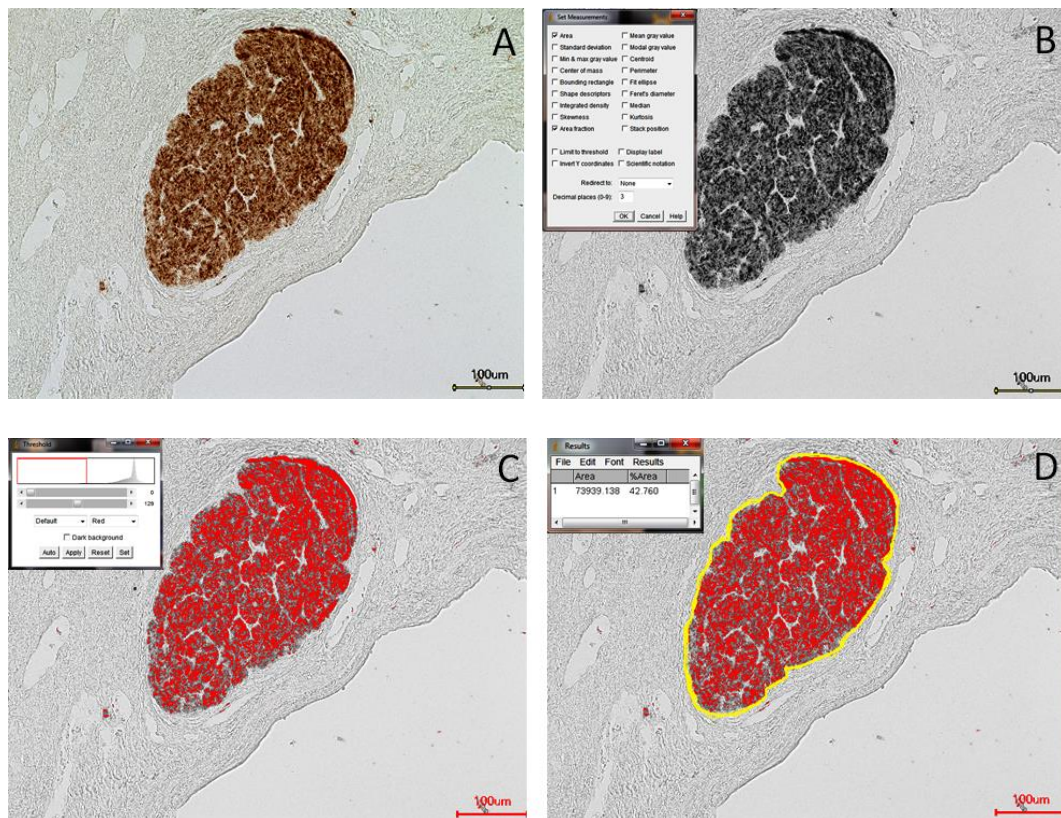


Abbildung 3: Computergestützte Auswertung (ImageJ) der immunreaktiven Fläche am Beispiel eines mit GAP-43 gefärbten HCC-Schnittes; A: Originalbild; B: Identisches Bild im 8-bit Dateiformat mit Einstellung der Messparameter; C: Einstellung des Schwellenwertes für die Bestimmung der Immunreaktivität mithilfe der „threshold“-Funktion; D: Festlegung der zu messenden Fläche und Ergebnis

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Aufarbeitung des Gewebes

Das für die Analysen verwendete Lebergewebe wurde direkt nach Erhalt aus dem Operationssaal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 80° C eingelagert.

3.2 RNA Isolation aus Lebergewebe

Im ersten Schritt wurden jeweils zirka 30 mg Lebergewebe im Dismembrator noch tiefgefroren pulverisiert und direkt mit 600 µl RLT Plus Puffer (RNeasy® Plus Mini Kit; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) behandelt. Dieser enthält Guanidinisothiocyanat, welches eine sofortige Inaktivierung von RNAsen bedingt, um die Isolierung intakter RNA zu gewährleisten. Das so gewonnene Gemisch wurde anschließend in einen QIAshredder (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) pipettiert und für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um eine vollständige Zerkleinerung des Gewebes zu erreichen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Lysat in ein gDNA Eliminator Tube Puffer (RNeasy® Plus Mini Kit; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) überführt und für weitere 30 Sekunden zentrifugiert. Die darin enthaltene Säule bedingt zusammen mit dem salzhaltigen Puffer eine effiziente Entfernung der genomischen DNA. Zu dem Lysat wurde nun 600 µl Ethanol gegeben, um geeignete Bindungsbedingungen für die RNA bereitzustellen. Das auf diese Weise entstandene Gemisch wurde anschließend in ein RNeasy spin Tube Puffer (RNeasy® Plus Mini Kit; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) überführt und für 30 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert. Es folgten weitere Waschschrte mit den Puffern RW1 und RPE Puffer (RNeasy® Plus Mini Kit; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland). Die RNA hat sich nun an die Membran der Säule gebunden, während Kontaminationen vollständig ausgewaschen wurden. Im letzten Arbeitsschritt wurde die an die Membran gebundene RNA in 30 µl RNase freiem Wasser (RNase-free water, 10 ml; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland) gelöst und durch eine weitere Zentrifugation gewonnen.

Bevor die RNA bei -80° C eingelagert wurde, erfolgte die Messung der Konzentration und Reinheit mit dem Spektrophotometer.

3.3 Synthese von cDNA

Da für die weiteren Versuche DNA benötigt wurde, war es notwendig, die bereits gewonnene RNA in cDNA (complementary DNA, komplementäre DNA) umzuschreiben.

Das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, verlängert an einem Oligo-dT-Nukleotid, welches als Primer dient und an die RNA bindet, den neu entstehenden komplementären Strang. Das Ergebnis dieser Reaktion sind zunächst cDNA-Stränge, die noch mit dem RNA-Strang verbunden sind. Diese müssen mithilfe des Enzyms RNase H getrennt werden. Die entstandene einzelsträngige cDNA wird dann mittels DNA-abhängiger Polymerase komplementiert. Als Primer dienen hierbei RNA-Reste.

Zunächst wurde nun ein DNase-Verdau durchgeführt, um eventuell vorhandene genomische DNA zu entfernen.

Für den DNase-Verdau wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 3: DNase-Verdau

Reagenzien	1x
RNA	2 µg
RQ1 RNase-freie DNase (Promega; Madiso, USA)	2 µl
RQ1 DNase Buffer 10x Reaction Buffer (Promega; Madiso, USA)	1 µl
DNase freies Wasser (Nuclease-Free Water; Ambion, USA)	Ad 10 µl

Der DNase-Verdau-Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl RQ1 DNase Stop Solution (Promega; Madiso, USA) dazugegeben und weitere 10 Minuten bei 65° C inkubiert, um vorhandene DNasen zu denaturieren.

Daraufhin erfolgte unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems; USA) die eigentliche Transkription der mRNA in cDNA. Im ersten Schritt wurde der Mastermix, der sich wie folgt

zusammensetzt, pipettiert.

Tabelle 4: Mastermix

Reagenzien	1x
10x RT Puffer	2 µl
10x RT Random Primer	2 µl
25x dNTP Mix (100mM)	0.8 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase 50U/µl	1 µl
Nuklease-freies Wasser	4.2 µl

Von diesem Mastermix wurden jeweils 10 µl zu den RNA-Proben gegeben, bevor sie im Mastercycler nach folgendem Schema inkubiert wurden:

10 Minuten bei 25° C

2 Stunden bei 37° C

5 Minuten bei 85 ° C

Anschließend wurden die Proben auf 4° C abgekühlt und bei -20°C eingelagert.

Um den DNase-Verdau zu kontrollieren und sicherzustellen, dass bei den folgenden Analysen ein positives Signal nicht von eventuell vorhandener genomischer DNA stammt, wurde zusätzlich bei jeder Umschreibung eine Probe ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Diese sogenannten –RT-Proben dienten in den folgenden Versuchen als Negativkontrollen.

3.4 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine Methode um DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Neben den zu kopierenden DNA-Fragmenten, die nicht länger als 3000 Basenpaare lang sein sollten, sind eine Reihe anderer Komponenten notwendig.

Zwei Primer legen auf den DNA-Einzelsträngen jeweils die Startpunkte der

Replikation fest (Denaturierung und Annealing). An diesen kann eine hitzebeständige Polymerase (z.B. taq-Polymerase) mit der Anlagerung der Desoxyribonucleosidtriphosphaten beginnen (Elongation). Durch Wiederholung dieser drei Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der Zielsequenz. Für die Funktion der Polymerase ist zudem die Anwesenheit von Magnesiumionen erforderlich. Des Weiteren stellt eine gepufferte Lösung eine geeignete Umgebung für den Ablauf der PCR sicher.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR mit einem Temperaturgradienten durchgeführt, um die optimale Annealingtemperatur der verwendeten Primer zu ermitteln. Der getestete Temperaturbereich umfasste 55° C bis 63° C.

Der hierfür verwendete Mastermix wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 5: Mastermix

Reagenz	1x
Nuklease-freies Wasser (Nuclease-Free Water; Ambion; USA)	34.25 µl
GoTaq Flexi Buffer (Promega; Madison, USA)	10 µl
MgCl ₂ (25mM) (Promega; Madison, USA)	2 µl
dNTPs (10mM) (Promega; Madison, USA)	1 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
GoTaq DNA Polymerase (Promega; Madison, USA)	0.25 µl

Zu 49.5 µl Mastermix wurde 1µl cDNA in einer Konzentration von 5 ng/µl pipettiert. Dieser stammte aus dem Plexus zöliakus eines Menschen.

Folgendes PCR-Protokoll wurde verwendet:

Initiale Denaturierung	95° C	60 Sek.	1 Zyklus
Denaturierung	95° C	30 Sek.	38 Zyklen
Annealing	Temperaturgradient	45 Sek.	38 Zyklen
Elongation	72° C	45 Sek.	38 Zyklen
Endgültige Elongation	72° C	10 Min.	1 Zyklus

Die dabei entstandenen PCR-Produkte wurden im Anschluss auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, um die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufzutrennen. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch ein elektrisches Feld zur Anode. Da kleinere Moleküle schneller wandern als größere, kann anhand einer DNA-Leiter bekannter Größe die Anzahl der Basenpaare, aus der das Fragment besteht, abgelesen werden. Um ein solches Gel herzustellen, wurden 4 g Agarose (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) in 200 ml 1xTBE für drei Minuten aufgekocht. Zur Visualisierung der DNA wurden anschließend 10 µl Ethidiumbromid (Q-Biogene; Irvine, USA) hinzugegeben. Dieses fluoresziert nach Interkalation in die DNA-Doppelhelix unter UV-Licht. Das noch flüssige Gel wurde anschließend zum Auskühlen in einen Gelträger gegossen und ein geeigneter Kamm eingesetzt. Nach ungefähr 30 Minuten konnte das Gel in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekommer mit jeweils 20 µl des PCR-Produkts beladen werden. Dieses wurde nun bei einer Spannung von 120 Volt für 30 Minuten aufgetrennt. Um die Ergebnisse zu visualisieren wurde das Gel im Anschluss in den Illuminator verbracht und dort aufgenommen.

3.5 qRT-PCR

Die Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion zur Vervielfältigung der DNA. Zusätzlich erlaubt die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die sich in die DNA einlagern, eine Quantifizierung der Zielsequenz. Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge der PCR-Produkte an und wird in jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase gemessen.

In dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I (LightCycler®

480 SYBR Green 1 Master; Roche Applied Science; Mannheim, Deutschland) verwendet. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht.

Nachdem die zu verwendenden Reagenzien auf Eis gelagert wurden, um ein langsames Auftauen dieser sicherzustellen, war der erste Arbeitsschritt die Anmischung des Mastermixes. Dieser setzte sich wie folgt zusammen und wurde für jedes Primerpaar einzeln angesetzt:

Tabelle 6: Mastermix

Reagenz	1x
DNase freies Wasser (Nuclease-Free Water (Ambion, USA)	3 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Light Cycler® 480 SYBR Green 1 Master	10 µl

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Proben, die auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt wurden, um eine gute Pipettierbarkeit zu gewährleisten, in eine 96-Well Platte (Starlab GmbH; Hamburg, Deutschland) pipettiert. In jedes Well wurden 5 µl vorgelegt, so dass die Gesamtmenge der Proben jeweils 25 ng betrug. Jede Probe wurde dabei für die einzelnen Primerpaare doppelt angesetzt.

Um mögliche Verunreinigungen mit DNA oder cDNA erkennen zu können, war es außerdem notwendig, Negativkontrollen mitlaufen zu lassen. Hierfür wurden zum einen DNase-freies Wasser, zum anderen eine sogenannte –RT Probe verwendet. Bei Letzterer handelte es sich um eine Probe, bei der während der Umschreibung von RNA in cDNA die Reverse Transkriptase ausgelassen wurde.

Anschließend wurden auf jede Probe 15 µl des bereits angesetzten Mastermixes pipettiert.

Zur Analyse wurde die Platte in den LightCycler 480 (Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim, Deutschland) verbracht, in dem bei einer Primer-

abhängigen Annealing-Temperatur nachfolgendes Programm durchlaufen wurde:

Denaturierung	95° C	5 Min.	1 Zyklus
PCR	95° C	10 Sek.	50 Zyklen
	Annealing-Temp.	15 Sek.	
	72° C	15 Sek.	
Schmelzkurve	95° C	5 Sek.	1 Zyklus
	65° C	1 Min.	
	97° C	0.1° C/Sek. ansteigend	
Kühlung	40° C	30 Sek.	1 Zyklus

Bei der qRT-PCR gibt es zwei Quantifizierungsmöglichkeiten: die absolute Quantifizierung und die relative Quantifizierung. Letztere wurde in dieser Arbeit verwendet. Die Expression des Zielgens wird dabei auf ein nicht reguliertes „Housekeeping Gen“, das ubiquitär und homogen exprimiert wird, in diesem Fall Cyclophilin B, normalisiert. Eine weitere Optimierung der Quantifizierung lässt sich durch die Einbeziehung der Effizienz des Primers erreichen. Für die Effizienzbestimmung wurde eine qRT-PCR mit einer Verdünnungsreihe von 5ng/μl bis 0,00001 ng/μl mit einer beliebigen Probe aus der Analysegruppe durchgeführt. Die eingesetzte Menge an cDNA wird hier in einer logarithmischen Funktion dargestellt, woraus letztlich mithilfe der LightCycler Software (Roche; Basel, Schweiz) die Effizienz errechnet werden kann. Für die eigentliche Quantifizierung des Zielgens wurden die Ct (cycle threshold)- bzw CP (Crossing Point)-Werte verwendet. Diese spiegeln die Anzahl der PCR Zyklen wieder, die nötig waren, um ein gleichmäßiges Fluoreszenzsignal zu erreichen. Je früher dieser Wert erreicht wurde, umso mehr cDNA war in der Ausgangsprobe vorhanden. Da der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 auch an unspezifische PCR-Produkte und Primerdimere bindet, wurde zur Überprüfung der Spezifität eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

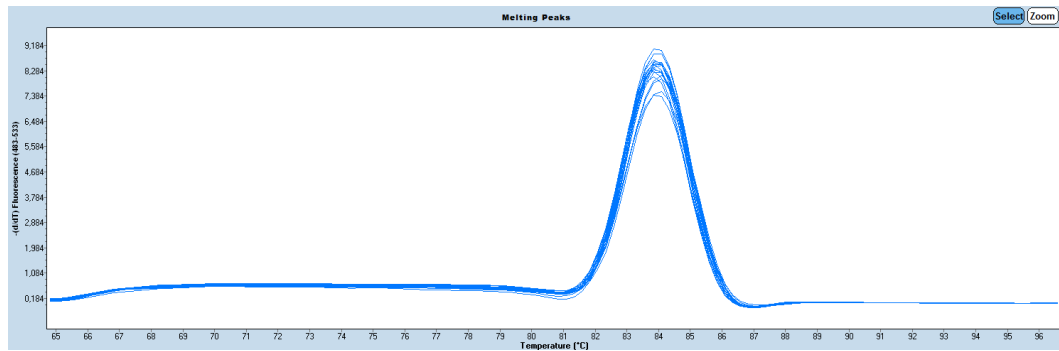


Abbildung 4: Schmelzkurve am Beispiel von NGF. Die Schmelztemperatur liegt bei zirka 84° C.

4 Statistik

Die Ergebnisse wurden univariat als Mittelwert \pm SEM (Standard Error of the Mean) berechnet. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Multiple Comparison Test verwendet. Um die Korrelation zweier Ereignisse zu bestimmen, wurde der Korrelationskoeffizient r nach Spearman bestimmt. Dabei ist $0.0 \leq r \leq 0.2$ kein Zusammenhang, $0.2 < r \leq 0.5$ ein schwacher bis mäßiger Zusammenhang, $0.5 < r \leq 0.8$ ein deutlicher Zusammenhang und $0.8 < r \leq 1.0$ ein hoher bis perfekter Zusammenhang. Das Signifikanzniveau für alle statistischen Analysen wurde auf $p \leq 0.05$ festgelegt, wobei $p < 0.01$ als deutlich signifikant und $p < 0.001$ als hochsignifikant angesehen wurde.

IV ERGEBNISSE

1 Neurale Plastizität

Zur Bestimmung der neuralen Hypertrophie und der neuralen Dichte wurden in der vorliegenden Arbeit immunhistochemische Färbungen mit anti-PGP9.5 angefertigt (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993).

Abbildung 5 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von mit anti-PGP9.5 gefärbtem Lebergewebe verschiedener Erkrankungen (A: gesundes Lebergewebe; B: Leberzirrhose; C: HCC; D: CCC). Deutlich zu erkennen sind auf diesen Bildern die angefärbten Nerven innerhalb der Portalfelder in unterschiedlicher Anzahl und Größe. Die kleinsten Nerven findet man innerhalb gesunder Lebern, wohingegen die größten in HCCs anzutreffen sind (s. auch Abb. 9). Dieser Größenunterschied der Nerven lässt sich ebenfalls auf den eingescannten Lebergewebeschnitten darstellen (Abb. 6). So kann man bei Leberzirrhosen, HCCs und CCCs (Abb. 6 B-C) bereits ohne deutliche Vergrößerung Nerven erkennen (mit Pfeilen markiert). Dies ist bei Scanbildern von normalem Lebergewebe nicht möglich (Abb. 6 A).

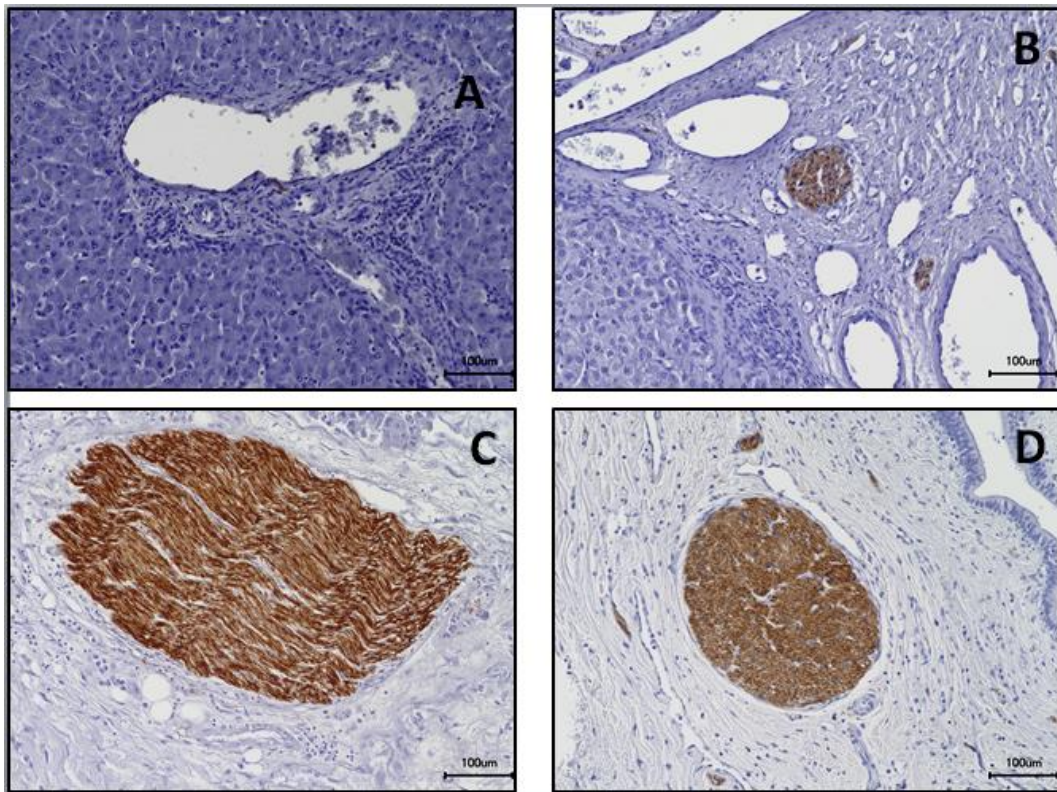


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahmen der mit anti-PGP9.5 gefärbten Lebergewebe; A: Gesundes Lebergewebe; B: Leberzirrhose; C: HCC; D: CCC; Die Nerven liegen innerhalb der Portalfelder in der Nähe von Blutgefäßen.

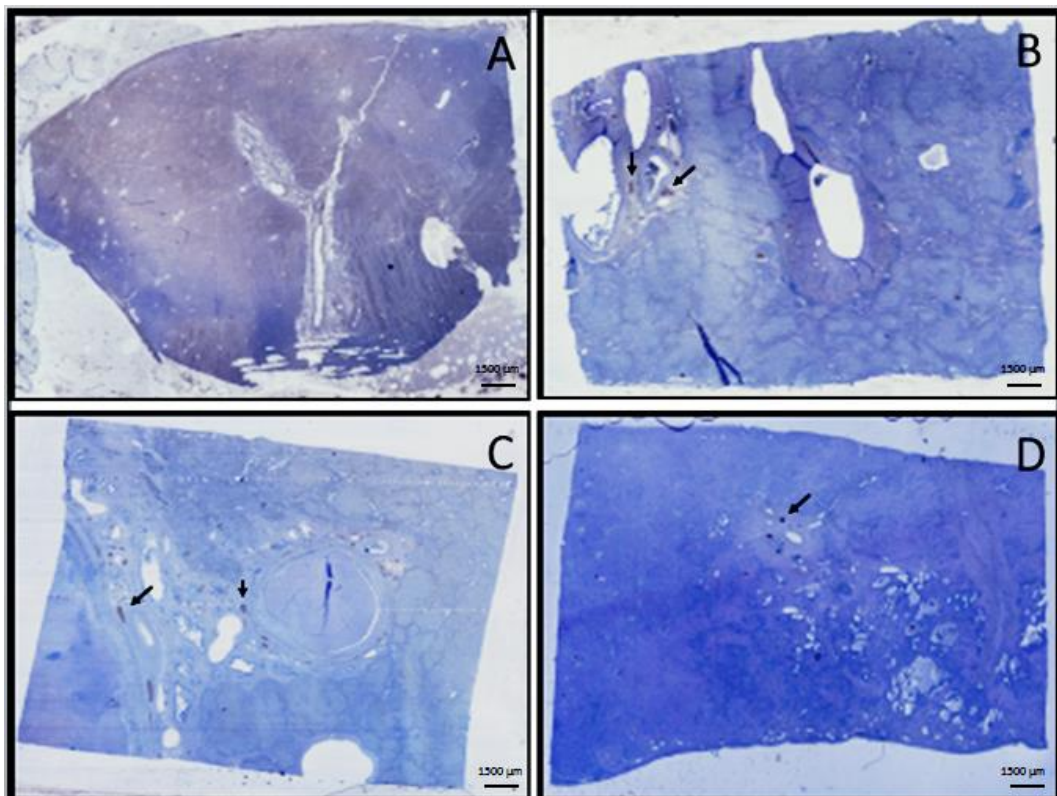


Abbildung 6: Eingescannte Gewebeschnitte der mit anti-PGP9.5 gefärbten Lebergewebe; A: Gesundes Lebergewebe; B: Leberzirrhose; C: HCC; D: CCC; Die Pfeile markieren bereits mit dem bloßen Auge sichtbare Nerven.

1.1 Lokalisation der Nerven

Neben der Analyse der Veränderungen von Größe und Anzahl der Nerven wurde zudem die Lokalisation des Nervengewebes innerhalb der Leber bei verschiedenen Erkrankungen untersucht.

Der Großteil der in den Lebern nachgewiesenen Nerven fand sich in den Portalfeldern, jedoch konnten vereinzelt auch zwischen den Hepatozyten Nervenfasern beschrieben werden. Diese Beobachtung wurde insbesondere in unmittelbarer Nähe zu den Portalfeldern gemacht (Abb. 5). Abbildung 5 zeigt mit anti-PGP9.5 gefärbte Lebergewebeschnitte, auf welchen sich Nerven angefärbt haben. Deutlich zu erkennen ist, dass sich größere Nerven vornehmlich in den Portalfeldern befinden. Kleinere Nervenfasern lassen sich bei gesunden Lebern (Abb. 7) und selten auch bei Leberzirrhosen zwischen den Hepatozyten finden. Diese liegen meist in der Nähe der Portalfelder. Größere Nervenfasern sind bei dieser Entität in Portalfeldern und bindegewebigen Septen zwischen den Regeneratknoten zu finden. In der vorliegenden Dissertationsschrift zeigte sich eine Abnahme der interhepatozytär gelegenen Nervenfasern am deutlichsten beim HCC bzw. CCC. Hier konnten zwischen den Hepatozyten keine Nervenfasern mehr detektiert werden. Nerven waren bei diesen Entitäten lediglich im Bereich von Portalfeldern und Gebieten mit ausgeprägter Fibrose nachweisbar (Abb. 8).

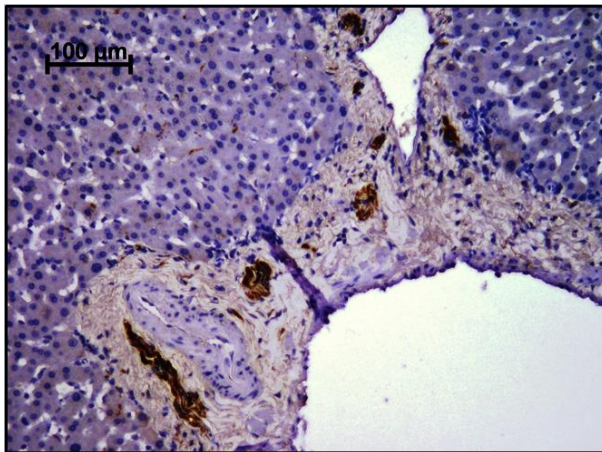


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit anti-PGP9.5 gefärbtem Lebergewebe (gesunder Patient). Auf dem Bild sind deutlich gefärbte Nerven zu erkennen. Kleine Nervenfasern sind zwischen den Hepatozyten sichtbar.

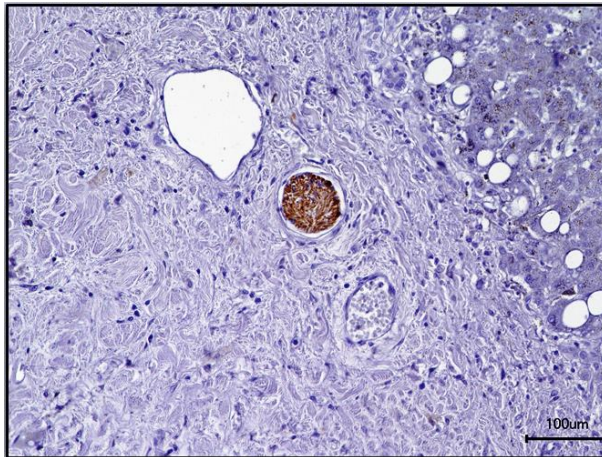


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit anti-PGP9.5 gefärbtem Lebergewebe (Patient mit HCC); Es sind keine Nervenfasern zwischen den Leberzellen zu erkennen.

1.2 Neurale Hypertrophie

Als neurale Hypertrophie bezeichnet man die Größenzunahme einzelner Nerven. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es nachzuweisen, inwiefern diese neben dem Pankreas auch in der Leber als zweite Darmanhangsdrüse zu finden ist. Zusätzlich zu normalem Lebergewebe wurden das HCC, das CCC und die Leberzirrhose als präkanzeröse Form dahingehend untersucht.

Der Mehrgruppenvergleich zwischen den medianen Nervengrößen der verschiedenen Entitäten zeigt einen deutlich signifikanten Unterschied ($p = 0.009$). Patienten, die an einem HCC ($27270 \pm 8178 \mu\text{m}^2$) erkrankt waren, zeigten gegenüber gesunden Leberarealen ($6446 \pm 3663 \mu\text{m}^2$) eine signifikante Vergrößerung der Gesamtnervenfläche. So war die 4.2-fache Vergrößerung der Nervenfläche als deutlich signifikant einzustufen ($p < 0.01$). Die 1.5-fache bzw. 1.8-fache Vergrößerung bei Zirrhose- ($9548 \pm 2484 \mu\text{m}^2$) und CCC – Patienten ($11900 \pm 3753 \mu\text{m}^2$) im Vergleich zum normalen Lebergewebe erreichte hingegen kein Signifikanzniveau. Ebenso verhielt es sich im Vergleich der Nervenflächen zwischen den verschiedenen Erkrankungen (Abb. 9).

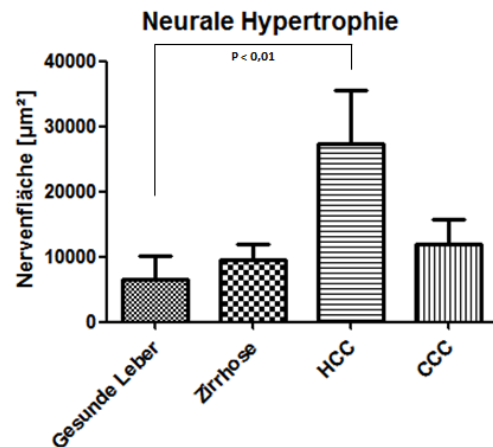


Abbildung 9: Graphische Darstellung der neuralen Hypertrophie bei unterschiedlichen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigt eine deutlich Signifikanz im Mehrgruppenvergleich ($p = 0.009$).

1.3 Neurale Dichte

Als neurale Dichte wird die Anzahl der Nerven pro Quadratmillimeter definiert. Für das Pankreas konnte gezeigt werden, dass diese beim PCa und bei der CP als dessen präkanzeröse Form im Vergleich zum gesunden Pankreas signifikant erhöht ist (Ceyhan, Bergmann et al. 2009).

In dieser Arbeit konnte im Mehrgruppenvergleich kein signifikanter Unterschied bezüglich der neuralen Dichte zwischen den Patientengruppen festgestellt werden ($p = 0.078$) (Abb. 10). Auch die Reduktion der Dichte um ca. 43% beim HCC (0.052 ± 0.006 Nerven/ mm^2) bzw. die Zunahme dieser um ca. 38% beim CCC (0.146 ± 0.056 Nerven/ mm^2) jeweils im Vergleich zum normalen Lebergewebe (0.0914 ± 0.022 Nerven/ mm^2) zeigte keine statistische Signifikanz. Ebenso verhielt es sich beim Vergleich der Gruppe der Leberzirrhosen (0.058 ± 0.016 Nerven/ mm^2) mit gesundem Lebergewebe und der verschiedenen Krankheiten untereinander. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Nerven pro definierter Gewebefläche festgestellt werden (Abb. 10).

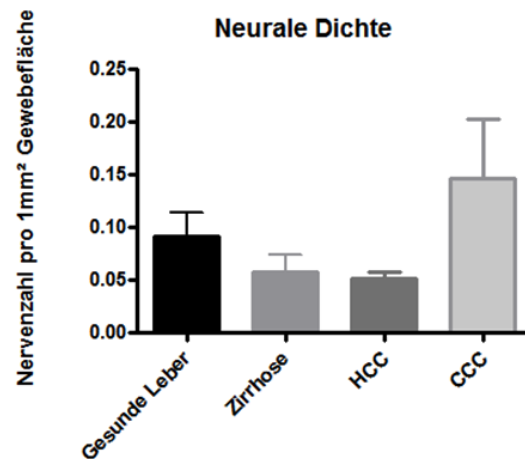


Abbildung 10: Graphische Darstellung der neuralen Dichte bei unterschiedlichen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine Signifikanz im Mehrgruppenvergleich ($p = 0.078$).

2 Expressionsanalysen neuraler Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

2.1 GAP-43

2.1.1 Immunhistochemie

In der zweiten Darmanhangsdrüse, dem Pankreas, konnte eine erhöhte Immunoreaktivität von GAP-43 in den Nerven bei der CP und dem PCa nachgewiesen werden. Diese war in vergrößerten Nerven besonders ausgeprägt (Fink and al. 1994; Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Immunoreaktivität dieses Proteins, das als bewährter Marker für neurale Plastizität bekannt ist, in den Nerven bei den verschiedenen Entitäten in der Leber untersucht.

Ein signifikanter Unterschied in der GAP-43-Immunoreaktivität ließ sich im Mehrgruppenvergleich nicht nachweisen ($p = 0.156$). Zwar zeigte die quantitative Analyse tendenziell in Richtung erhöhter Immunoreaktivität in den Nerven bei Leberzirrhosen (32.77 ± 5.162), bei den HCCs (38.34 ± 6.340) und insbesondere bei den CCCs (51.34 ± 14.59) mit einer Zunahme um 36% im Vergleich mit normalen Lebergewebe (18.74 ± 4.552), jedoch ließen sich keine statistisch

signifikanten Unterschiede ermitteln (Abb. 12).

Obwohl sich im Vergleich der einzelnen Krankheiten untereinander keine signifikanten Unterschiede der GAP-43-Immunoreaktivität herausarbeiten ließen, lässt sich in einer semiquantitativen Analyse vermuten, dass der Wachstumsfaktor innerhalb der CCCs am stärksten exprimiert wird (Tab.7).

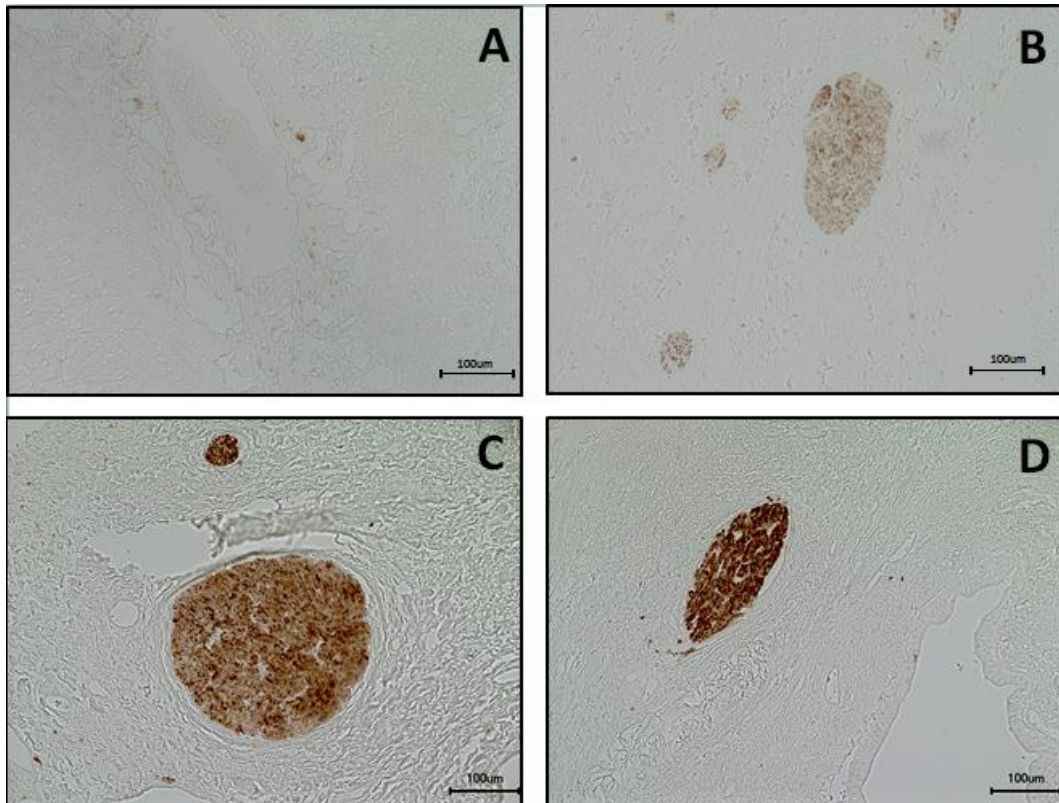


Abbildung 11: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit anti-GAP-43 gefärbtem Lebergewebe; A: Gesunde Leber; B: Leberzirrhose; C: HCC; D: CCC; Auf allen Bildern lassen sich die Nerven deutlich vom umgebenden Gewebe abgrenzen.

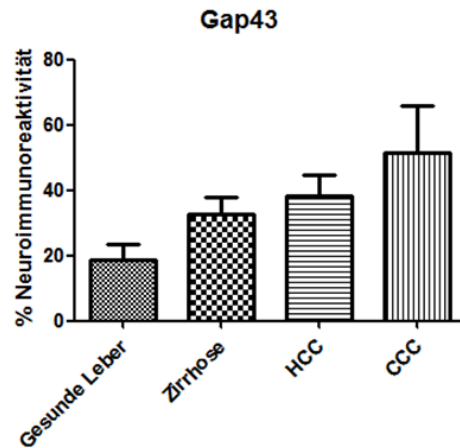


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Immunoreaktivität von GAP-43 in den Nerven bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine Signifikanz im Mehrgruppenvergleich ($p = 0.156$).

2.1.2 qRT-PCR

Zusätzlich zu der Untersuchung der Immunoreaktivität der Nerven wurde die relative Expression von GAP-43 auf mRNA-Ebene ermittelt. Um eine einheitliche Darstellung der relativen Expression zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Werte normalisiert. Hierfür wurde die relative Expression in der normalen Leber gleich eins gesetzt. Dies gilt auch für NGF, TrkA und $p75^{\text{NTR}}$.

Die Expressionsanalysen von GAP-43 zeigten auf mRNA-Ebene keinen signifikanten Unterschied im Mehrgruppenvergleich ($p = 0.593$). Obwohl die relative Expression in der normalen Leber (1.0 ± 0.45) am niedrigsten war, erreichten die Anstiege bei der Leberzirrhose (14.74 ± 13.29), beim CCC (6.625 ± 2.940) und insbesondere im HCC (26.85 ± 17.81) auch im direkten Vergleich kein Signifikanzniveau (Abb. 13).

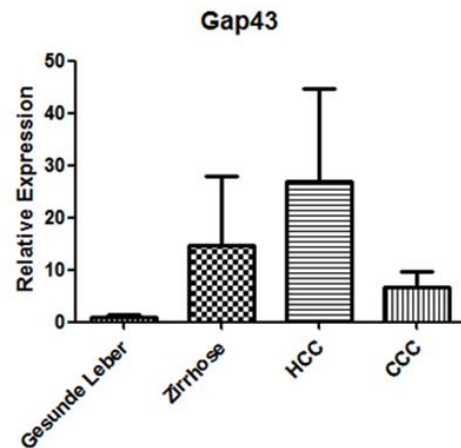


Abbildung 13: Graphische Darstellung der relativen Expression von GAP-43 bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine Signifikanz im Mehrgruppenvergleich ($p = 0.593$).

2.2 NGF

2.2.1 Immunhistochemie

In immunhistochemischen Untersuchungen des Pankreas konnte NGF, der als potenter Wachstumsfaktor bekannt ist, im Zytoplasma von PCa-Zellen nachgewiesen werden. Zusammen mit seinem Rezeptor TrkA, der im Perineurium intrapankreatischer Nerven detektiert wurde, scheint das Protein das Wachstum dieser Nerven zu beeinflussen (Zhu, Friess et al. 1999). Um zu klären, ob NGF auch innerhalb der Leber das Nervenwachstum beeinflusst, wurde in dieser Arbeit die Immunoreaktivität bei verschiedenen Entitäten bestimmt (Abb. 14 und Abb. 16).

Nerven, die eine NGF-Immunoreaktivität aufwiesen, befanden in Portalfeldern oder Bereichen früherer Portalfelder. Mit diesem Antikörper ließen sich allerdings keine Nervenfasern zwischen den Hepatozyten detektieren (Abb. 15).

Die graphische Darstellung der Expression von NGF innerhalb des Nervengewebes deutet eine unterschiedliche Tendenz zwischen den untersuchten Gruppen an, allerdings zeigte der Mehrgruppenvergleich keine statistische Signifikanz ($p = 0.493$). Auch der direkte Vergleich der Immunoreaktivität in normalem Lebergewebe (16.16 ± 6.629) mit der in den Lebererkrankungen

(Leberzirrhose: 0.789 ± 0.435 ; HCC: 4.653 ± 2.958 ; CCC: 9.559 ± 3.570) und die direkte Gegenüberstellung zwischen den einzelnen Erkrankungen erreichte keinen signifikanten Unterschied (Abb. 16).

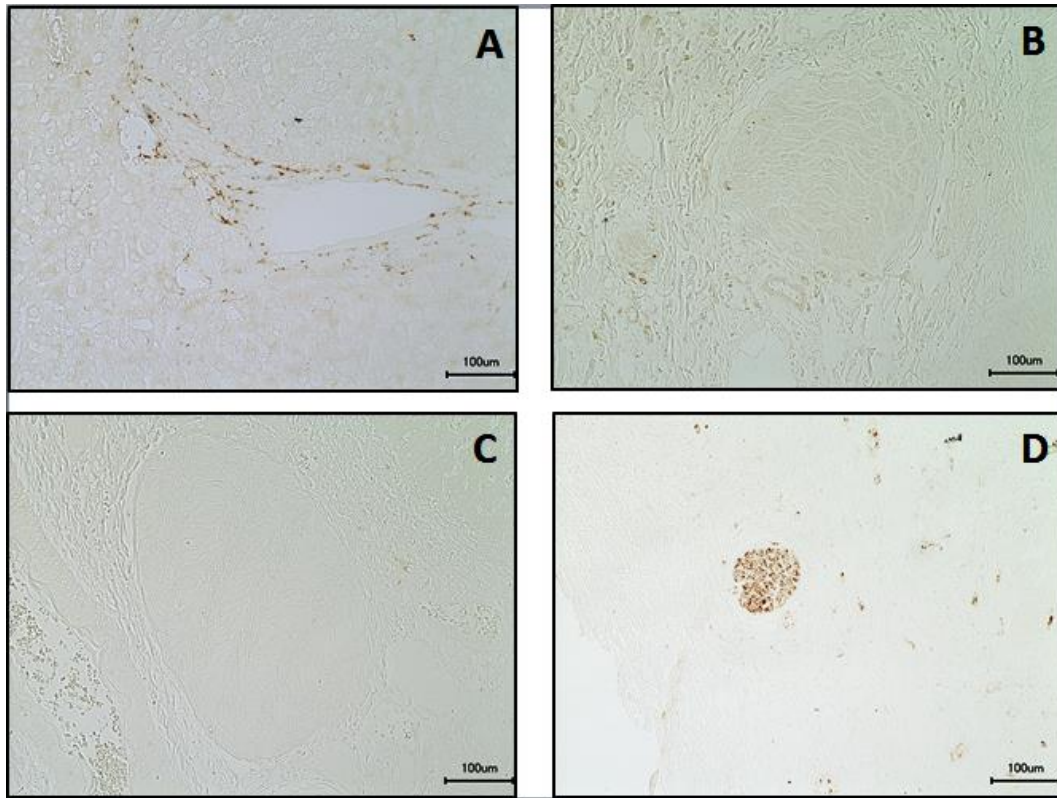


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit anti- NGF gefärbtem Lebergewebe; A: Gesunde Leber; B: Zirrhose; C: HCC; D: CCC; Auf den Bildern sind Nerven in unterschiedlicher Färbintensität zu erkennen.

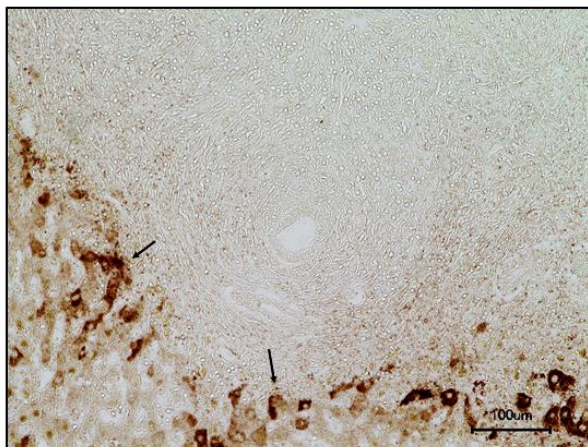


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit anti-NGF gefärbtem Lebergewebe (CCC). Die deutliche Färbung der Hepatozyten ist gut zu erkennen (Pfeile).

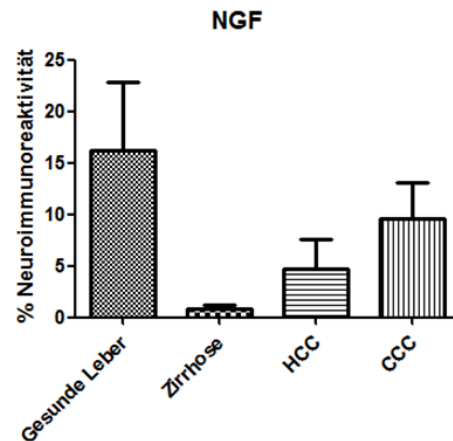


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Ausmaßes der Immunoreaktivität in den Nerven von NGF bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine statistische Signifikanz im Mehrgruppenvergleich ($p = 0.493$).

2.2.2 qRT-PCR

Da die mRNA-Expression von NGF im Pankreas mit der neuralen Dichte und der neuralen Hypertrophie korreliert, war die Untersuchung dieser in der Leber bei verschiedenen Entitäten ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Die Expressionsanalysen von NGF in der Leber zeigten keinen signifikanten Unterschied im Mehrgruppenvergleich auf mRNA-Ebene ($p = 0.074$). Ebenso verhielt es sich im direkten Vergleich der Gruppen untereinander. So waren die Zunahmen der relativen Expression im CCC (4.043 ± 2.182) im Vergleich zur normalen Leber (0.999 ± 0.332), zur Leberzirrhose (0.242 ± 0.075) und zum HCC (0.131 ± 0.064) aufgrund der großen Varianz der relativen Expression innerhalb der einzelnen Entitäten nicht signifikant. Ebenso kein Signifikanzniveau erreichten die Abnahmen der relativen Expression in den Leberzirrhosen und in den HCCs im Vergleich mit der in normalen Lebern (Abb. 17).

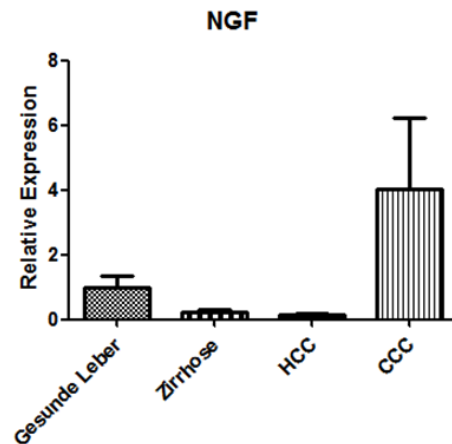


Abbildung 17: Graphische Darstellung der relativen Expression von NGF bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte im Mehrgruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied ($p = 0.074$).

2.3 TrkA

2.3.1 Immunhistochemie

Die folgende Bestimmung der TrkA-Immunoreaktivität in den Nerven innerhalb der Leber bei verschiedenen Entitäten sollte klären, inwiefern diese wie beim Pankreas mit den in der Leber beobachteten nervalen Veränderungen korreliert.

Abbildung 18 repräsentiert die Immunoreaktivität für TrkA in Nerven innerhalb unterschiedlicher Lebererkrankungen. Es zeigte sich eine unterschiedliche Tendenz in der Expression von TrkA, allerdings konnte der Mehrgruppenvergleich keine eindeutige Signifikanz nachweisen ($p = 0.499$). Ebenso verhielt es sich mit den direkten Vergleichen der Immunoreaktivität zwischen den verschiedenen Entitäten. Auch hier konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Die der Berechnung zugrunde liegenden Einzelwerte lagen bei 34.34 ± 8.751 für gesunde Leberproben, bei 22.01 ± 4.564 für Leberzirrhosen, bei 27.80 ± 7.613 für HCCs und bei 19.59 ± 8.455 für CCCs (Abb. 20).

Es zeigte sich in den Färbungen allerdings, dass Hepatozyten neben NGF auch den Rezeptor TrkA exprimieren (Abb. 19)

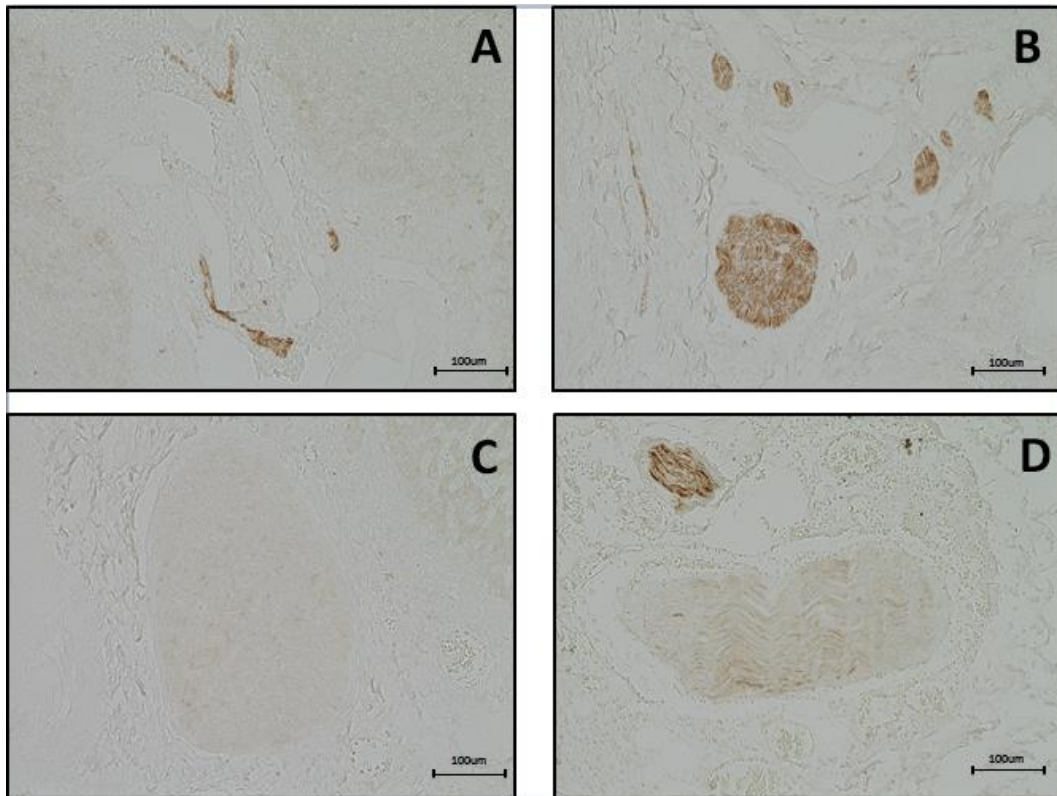


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit anti-TrkA gefärbtem Lebergewebe; A: Gesunde Leber. Hier ist zusätzlich eine Färbung der Hepatozyten festzustellen; B: Leberzirrhose; C: HCC; D: CCC; Auf allen Bildern sind Nerven zu erkennen, die sich in unterschiedlicher Intensität angefärbt haben.

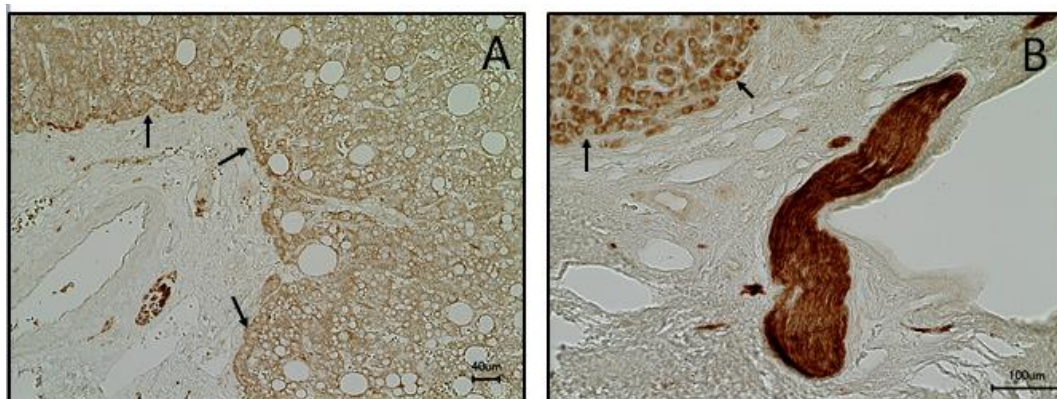


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit anti-TrkA gefärbtem Lebergewebe; A: Gesunde Leber; B: HCC; Auf beiden Bildern sind Nerven zu erkennen. Pfeile markieren angefärbte Hepatozyten.

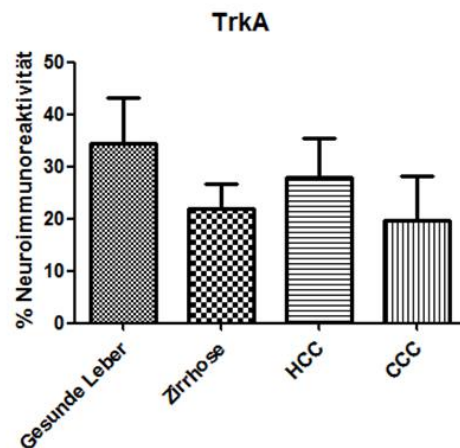


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Immunoreaktivität von TrkA in den Nerven bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine Signifikanz ($p = 0.499$).

2.3.2 qRT-PCR

Da immunhistochemische Untersuchungen eine Expression von TrkA innerhalb der Hepatozyten zeigten, stellte sich die Frage, ob sich diese auf mRNA – Ebene zwischen normalem Lebergewebe und Lebererkrankung verändert. Darüber hinaus war es Ziel der vorliegenden Dissertationsschrift, dies mit den beobachteten nervalen Veränderungen in diesem Organ in Zusammenhang zu bringen.

Die durchgeführten Analysen zeigten im Mehrgruppenvergleich einen signifikanten Unterschied in der relativen Expression von TrkA in Lebergeweben verschiedener Entitäten ($p = 0.041$) (Abb. 21). Direkte Vergleiche zwischen den einzelnen Entitäten brachten dagegen keine signifikanten Unterschiede hervor. Die zugrundeliegenden Einzelwerte der relativen Expression lauteten 1.000 ± 0.230 für gesunde Lebern, 6.580 ± 2.992 für Leberzirrhosen, 0.442 ± 0.291 für HCCs und 20.38 ± 9.853 für CCCs.

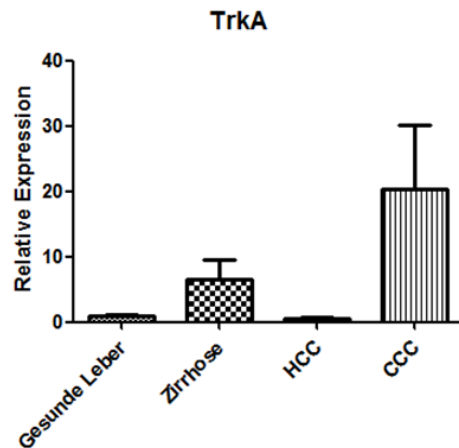


Abbildung 21: Graphische Darstellung der relativen Expression von TrkA bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte im Mehrgruppenvergleich einen signifikanten Unterschied ($p = 0.041$).

2.4 p75^{NTR}

2.4.1 Immunhistochemie

Die nachfolgende immunhistochemische Untersuchung sollte zeigen, inwiefern die Immunoreaktivität von p75^{NTR} in den Nerven Veränderungen unterliegt und ob sich diese mit der neuronalen Hypertrophie und der neuronalen Dichte korrelieren lassen.

Charakteristisch bei dieser Färbung war neben der Farbreaktion, die die Nerven zeigten, die deutliche Anfärbbarkeit des Perineuriums, das sich gut von dem eigentlichen Nerven abgrenzen ließ (Abb. 22 B und C). Des Weiteren zeigte auch das Bindegewebe innerhalb der untersuchten Lebergewebeproben deutliche Farbreaktionen (Abb. 22 A).

Der Mehrgruppenvergleich zeigte hier einen deutlich signifikanten Unterschied der Immunoreaktivitäten ($p = 0.002$). Zusätzlich ließen sich statistisch signifikante Unterschiede dieser zwischen gesunden Lebern (54.89 ± 1.98) und Zirrhosen (16.84 ± 3.559) ($p < 0.05$) bzw. HCCs (10.38 ± 3.456) feststellen. Letzterer zeigte sich mit einem p – Wert von < 0.01 sogar deutlich signifikant. Der Einzelwert der

Immunoreaktivität in CCCs lag bei 38.29 ± 10.51 (Abb. 23). Tabelle 7 zeigt, dass $p75^{\text{NTR}}$ innerhalb der gesunden Lebergewebe der am stärksten exprimierte Faktor ist

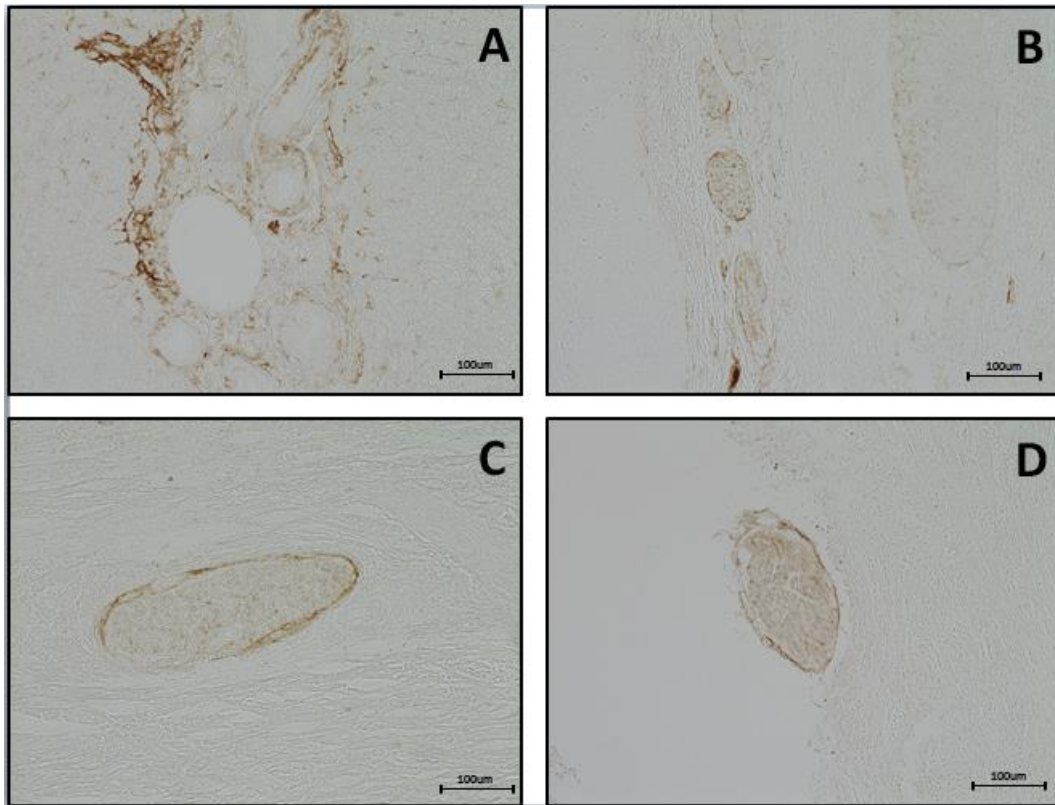


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit anti- $p75^{\text{NTR}}$ gefärbtem Lebergewebe; A: Gesunde Leber. Das Bindegewebe, in das Nerven eingebettet ist, ist ebenfalls deutlich angefärbt; B: Zirrhose; C: HCC; D: CCC; Auf allen Bildern sind Nerven zu erkennen, die sich in unterschiedlicher Intensität angefärbt haben.

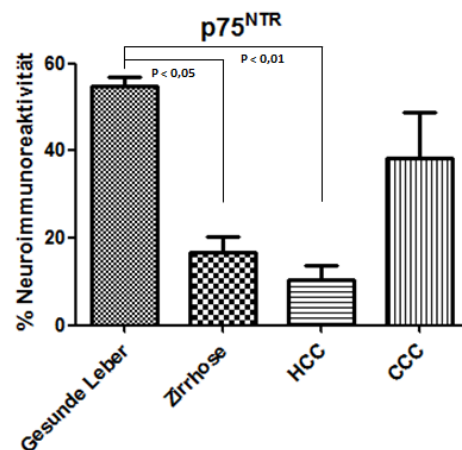


Abbildung 23: Graphische Darstellung der Immunoreaktivität von p75^{NTR} in den Nerven bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigt im Mehrgruppenvergleich einen deutlich signifikanten Unterschied ($p = 0.002$).

2.4.2 qRT-PCR

Die zur Vervollständigung mittels qRT-PCR durchgeführten p75^{NTR} Expressionsanalysen konnten auf mRNA-Ebene die in der Immunhistochemie erzielten Ergebnisse nahezu vollständig bestätigen. Entsprechend zeigte der Mehrgruppenvergleich zwischen den verschiedenen Entitäten einen deutlich signifikanten Unterschied ($p = 0.001$). Zusätzlich konnte der direkte Vergleich zwischen den Patientengruppen eine deutlich signifikante Abnahme der Expression von normalem Lebergewebe (1.001 ± 0.213) zu den HCCs (0.160 ± 0.152) ($p < 0.01$). Obwohl die relative Expression von p75^{NTR} bei gesunden Lebern zum CCC (0.469 ± 0.280) um ca. 53% abnahm, konnte hier keine Signifikanz nachweisen werden. Ebenso verhielt es sich mit der Reduktion der relativen Expression bei den Leberzirrhosen (0.353 ± 0.128) (Abb. 23).

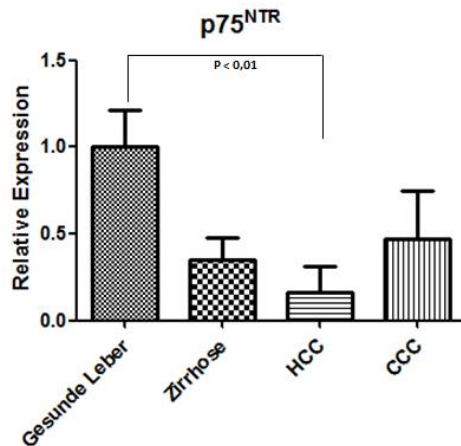


Abbildung 24: Graphische Darstellung der relativen Expression von p75^{NTR} bei verschiedenen Lebererkrankungen. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte im Mehrgruppenvergleich einen deutlich signifikanten Unterschied ($p = 0.001$).

Tabelle 7: Semiquantitative Analyse der Immunoreaktivität in den Nerven

	GAP-43	NGF	TrkA	p75 ^{NTR}
Gesunde Leber	+	+	++	+++
Leberzirrhose	++	+/-	+	+
HCC	++	+/-	++	+
CCC	+++	+	+	++

3 Korrelationsanalysen

Um festzustellen inwieweit die Immunoreaktivität von GAP-43, NGF und dessen Rezeptoren mit der Plastizität der Nerven in den verschiedenen Entitäten korreliert, führten wir Korrelationsanalysen nach Spearman durch.

Diese zeigten in der Leberzirrhose und dem HCC keine Korrelation zwischen den untersuchten Faktoren und der neuralen Hypertrophie bzw. Dichte (Tab. 9 und 10). In der gesunden Leber, in der die kleinsten Nerven und die höchste Expression von NGF zu finden waren konnte eine Korrelation zwischen der

Immunoreaktivität des Wachstumsfaktors und der neuronalen Hypertrophie festgestellt werden ($r = 0.999$ und $p = 0.012$) (Tab. 8). Im CCC ließen sich Gap-43, TrkA und p75^{NTR} mit der Anzahl der Nerven pro definierter Gewebefläche korrelieren. Dabei war die gegenläufige Beziehung zwischen p75^{NTR} und der neuronalen Dichte deutlich signifikant ($r = -0.962$ und $p = 0.009$). Auch bei GAP-43 zeigte sich eine inverse Korrelation ($r = -0.954$ und $p = 0.012$) (Tab. 11).

Tabelle 8: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman (Immunoreaktivität in der gesunden Leber)

	Neurale Hypertrophie		Neurale Dichte	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
GAP-43	0.555	0.625	0.621	0.574
NGF	0.999	0.012 (*)	-0.289	0.813
TrkA	0.639	0.558	0.535	0.641
p75^{NTR}	-0.450	0.703	0.988	0.098

Tabelle 9: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman (Immunoreaktivität in der Leberzirrhose)

	Neurale Hypertrophie		Neurale Dichte	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
GAP-43	0.245	0.525	-0.216	0.577
NGF	-0.230	0.551	-0.040	0.918
TrkA	-0.586	0.075	-0.102	0.793
p75^{NTR}	-0.147	0.707	-0.236	0.541

Tabelle 10: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman (Immunoreaktivität im HCC)

	Neurale Hypertrophie		Neurale Dichte	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
GAP-43	0.236	0.574	-0.012	0.978
NGF	-0.315	0.447	-0.413	0.31
TrkA	0.390	0.339	0.273	0.513
p75^{NTR}	-0.487	0.221	-0.61	0.109

Tabelle 11: Ergebnisse der Korrelationsanalyse nach Spearman (Immunoreaktivität im CCC)

	Neurale Hypertrophie		Neurale Dichte	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
GAP-43	-0.311	0.610	-0.954	0.012 (*)
NGF	0.279	0.649	-0.220	0.722
TrkA	0.105	0.867	0.952	0.012 (*)
p75^{NTR}	-0.272	0.659	-0.962	0.009 (**)

V DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass es zwischen normalen Lebern, Leberzirrhose und den malignen Lebererkrankungen HCC und CCC zu einer signifikanten intrahepatischen neuralen Hypertrophie kommt. Im Pankreas geht dieses Phänomen mit einer Erhöhung der neuralen Dichte einher (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Zudem konnte eine Beteiligung des potenten neurotrophen Faktors NGF und des Wachstumsfaktor GAP-43 an der Neuropathie des Pankreas nachgewiesen werden (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). In der Leber war hingegen keine erhöhte neurale Dichte messbar. Dies weist darauf hin, dass höchstwahrscheinlich keine aktive Einsprossung von Nervengewebe stattfindet, sondern bereits vorhandene Nerven hypertrophieren. Die Beteiligung des potenten neurotrophen Faktors NGF und des Wachstumsfaktors GAP-43 an der Neuropathie des Pankreas konnte bereits nachgewiesen werden (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Zudem konnte im Rahmen dieser Dissertationsschrift weder für GAP-43 noch für NGF eine direkte Beteiligung an der Hypertrophie intrahepatischer Nerven festgestellt werden. Unabhängig von der Rolle des NGF weisen die Ergebnisse dieser Arbeit allerdings darauf hin, dass der NGF-Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$ eine Schlüsselrolle bei den beobachteten Veränderungen der intrahepatischen Nerven hat.

Die hepatische Innervation in der humanen Leberzirrhose, im HCC und CCC

Die Innervation der Leber erfolgt über die beiden Äste des autonomen Nervensystems. Ein Großteil dieser Nerven tritt mit Blutgefäßen und Gallengängen in das Organ ein, was ursprünglich dazu führte, dass diesen Nervenfasern aufgrund ihrer anatomischen Nähe rein motorische Funktionen zugeschrieben wurden (Lee, Ahmed et al. 1992). In den folgenden Jahren gelang der Nachweis von Nervenfasern innerhalb des Leberparenchyms, insbesondere in der Nähe von Portalfeldern, so dass davon auszugehen ist, dass diese auch bedeutende metabolische und sensorische Funktionen wahrnehmen (Lee, Ahmed et al. 1992). Da es nach einer Denervation der Leber durch chirurgisches oder pharmakologisches Eingreifen nicht zu nennenswerten Abweichungen im

metabolischen Gleichgewicht kommt, wird vermutet, dass Autoregulationsmechanismen innerhalb des Organs den Metabolismus in Ruhesituationen zu regulieren. Die autonome Innervation scheint hingegen insbesondere unter „fight or flight“-Situationen von Bedeutung zu sein (Püschel 2004; Yi, la Fleur et al. 2010).

Zum Nachweis intrahepatischer Nerven wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der etablierte Marker PGP9.5 verwendet, der selbst kleine intralobulär gelegene Nervenfasern detektieren kann (Lee, Ahmed et al. 1992; Fink and al. 1994). In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass der Großteil der Nerven der normalen Leber in Portalfeldern und damit in der Nähe von Gefäßen und Gallengängen lokalisiert ist. Darüber hinaus konnten auch im umgebenden Parenchym nervale Strukturen nachgewiesen werden. Diese dominieren in unmittelbarer Nähe zu den Portalfeldern, insbesondere zwischen benachbarten Portalfeldern. Dieser heterogenen Verteilung der Nervenfasern messen Scoazec und Kollegen große Bedeutung bei, da auch metabolische Funktionen der Hepatozyten innerhalb eines Lobus heterogen verteilt zu sein scheinen (Scoazec and Racine 1993). Die Vermutung, dass Nerven die regenerative Aktivität der Hepatozyten kontrollieren, konnte im Tierversuch noch nicht ausreichend bestätigt werden, da beispielsweise Ratten die parenchymale Innervation der Leber fehlt (Lee, Ahmed et al. 1992; Terada and Matsunaga 2001). Diese These wird untermauert von der Beobachtung, dass im Rahmen der Leberzirrhose, welche von Degeneration und versuchter Regeneration der Hepatozyten geprägt ist, die parenchymale Innervation abnimmt und zum Teil vollständig zu verschwinden scheint (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993). Dieses Phänomen konnte ebenfalls in der vorgelegten Arbeit nachgewiesen werden. In der gesunden humanen Leber konnten zwischen den Hepatozyten vereinzelt Nervenstränge nachgewiesen werden, wohingegen in den Regeneratknoten keine Nerven nachweisbar waren. Es wird vermutet, dass es zahlreiche Wachstumsfaktoren gibt, die die Proliferation der Hepatozyten und der Sinusoidzellen stimulieren, jedoch keine Faktoren vorhanden sind, die das Einwachsen von Nervenfasern in die entstehenden Regeneratknoten anregen (Lee, Ahmed et al. 1992). Diese These wird durch den erniedrigten NGF-Spiegel in den Leberzirrhose-Proben unterstützt. Das unabhängig von der Ätiologie der Leberzirrhose fast vollständige Fehlen der parenchymalen Innervation könnte

erklären, weshalb Durchblutung und Metabolismus der Leber bei diesen Patienten dramatische Veränderungen zeigen (Scoazec and Racine 1993). Die zugrundeliegenden Mechanismen des Rückgangs der parenchymalen Innervation sind bis heute weitestgehend ungeklärt. So konnten Vermutungen, dass die Degeneration der Nerven in der sich entwickelnden Zirrhose Teil des primären Leberschadens ist (Miyazawa, Fukuda et al. 1988), bereits 1992 von Lee und Kollegen widerlegt werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch keine befriedigende Erklärung für dieses Phänomen erbracht worden. Wichtige Faktoren scheinen in diesem Zusammenhang die progressive Zerstörung der normalen Struktur der Portalfelder, die den Großteil der Nerven beherbergen, (Scoazec and Racine 1993) und die Beschädigung parenchymaler Nerven durch die fortschreitende Fibrose (Lee, Ahmed et al. 1992) zu sein. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, scheint ein weiterer Grund der Verlust des Neurotrophismus in der Leberzirrhose durch eine deutliche Abnahme der Expression von neurotrophen Faktoren, wie NGF, zu sein.

Terada und Kollegen hatten bereits zuvor zeigen können, dass innerhalb des HCC keine Nervenfasern nachweisbar sind (Terada and Matsunaga 2001). Dies konnte ebenfalls durch die vorgelegte Dissertationsarbeit reproduziert werden.

Im Rahmen dieser Studie konnten in CCCs ebenfalls keine intratumoralen Nerven nachgewiesen werden. Terada und Kollegen detektieren lediglich einige wenige Nervenfasern im Stroma von CCC-Proben. Nerven, die innerhalb des Tumors in verbliebenen Portalfeldern gesehen werden konnten, haben ihren Ursprung vermutlich in bereits bestehenden Nerven der Portalfelder und wurden von dem invasiven CCC eingeschlossen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass weder das HCC noch das CCC selbst innerviert sind (Terada and Matsunaga 2001). In der vorliegenden Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass sich die detektierten Nerven bei HCC- bzw. CCC-Patienten, ähnlich wie bei Zirrhosepatienten, innerhalb bindegewebiger Septen und desmoplastischen Arealen befanden. Hierbei handelt es sich vermutlich um bereits vorhandenes Nervengewebe, das von dem Tumor eingenommen wird.

Hepatische Neuroplastizität

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es verhältnismäßig wenige Studien, die sich mit

der Rolle des autonomen Nervensystems bei viszeralen Neoplasien beschäftigten. Studien am Pankreas ergaben, dass sowohl bei der chronischen Pankreatitis als auch beim Pankreaskarzinom das Innervationsmuster und die Qualität der intrapankreatischen Nerven signifikant verändert sind (Ceyhan, Demir et al. 2009). Zu diesen Veränderungen, die unter dem Begriff der „pankreatischen Neuropathie“ zusammengefasst werden, gehören neben der pankreatischen Neuritis und der neuralen Invasion von Karzinomzellen auch die Zunahme der Größe (Hypertrophie) und der Dichte von intrapankreatischen Nerven (Bockman, Buchler et al. 1988; Ceyhan, Demir et al. 2008; Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Demir et al. 2009). In der Leber haben sich bisher publizierte Studien schwerpunktmäßig mit der Lokalisation von intrahepatischen Nerven in Lebererkrankungen beschäftigt. Die Frage, ob die vorhandenen Nerven in der Leberzirrhose, im HCC oder im CCC eine „hepatische Neuroplastizität“ zeigen, blieb bis heute unerforscht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass es auch in der Leber zur neuralen Hypertrophie kommt. Die einzelnen Nerven nehmen im Vergleich zur gesunden Leber über das Stadium der Leberzirrhose bis zum HCC bzw. CCC signifikant an Größe zu. Am deutlichsten ist dieses Phänomen beim HCC. Selbst im Pankreas, das in Bezug auf diese Fragestellung besser erforscht ist als die Leber, sind die Mechanismen, die zu neuraler Hypertrophie und anderen Veränderungen der Nerven führen, noch nicht vollständig geklärt (Ceyhan, Giese et al. 2006). Im Pankreas scheint der Ausprägungsgrad der Fibrose direkt mit der neuralen Hypertrophie zu korrelieren (Ceyhan, Bergmann et al. 2007). Dies könnte eine weitere Parallele zur Leber darstellen. HCCs entwickeln sich in erster Linie aus einer hochgradigen und über Jahren bestehenden Zirrhose.

Die neurale Dichte in der Leber zeigt im Vergleich zu den Beobachtungen im Pankreas keine Unterschiede zwischen den Entitäten. So konnten Ceyhan und Kollegen zeigen, dass es bei der chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom neben neuraler Hypertrophie auch zu einer Zunahme der neuralen Dichte kommt (Ceyhan, Bergmann et al. 2009). In dieser Studie konnten zwischen gesunden Lebern und Lebererkrankungen (Zirrhose, HCC, CCC) keine signifikanten Unterschiede in der neuralen Dichte ermittelt werden.

Einfluss neurotropher Faktoren auf die hepatische Neuroplastizität

Es ist bekannt, dass sowohl die chronische Pankreatitis als auch das Pankreaskarzinom neurotrophe Eigenschaften aufweisen, die zu einer aktiven Aussprossung der intrapankreatischen Nerven führen und somit die charakteristische „pankreatische Neuropathie“ einleiten (Friess and Zhu 1999; Ceyhan, Bergmann et al. 2007; Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Zum Nachweis der spezifischen Neuroplastizität verwendeten die Autoren GAP-43, einen etablierten Marker für die neurale Plastizität während der nervalen Entwicklung und nach Nervenverletzungen (Fink and al. 1994). Die nervale Überexpression von GAP-43 war unmittelbar mit dem Ausmaß der pankreatischen Neuroplastizität in der chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom assoziiert. Somit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die neuralen Veränderungen durch aktive nervale Umbauprozesse bedingt sind (Fink and al. 1994; Friess and Zhu 1999; Ceyhan, Bergmann et al. 2007; Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Eine ähnliche Beobachtung zeigte sich in der vorgelegten Studie, in der die GAP-43-Immunoreaktivität im HCC im direkten Vergleich zur normalen Leber tendenziell anstieg. Dies ließ sich gut mit den Ergebnissen der neuralen Hypertrophie vereinbaren, da genau in dieser Entität die prominentesten Nerven identifiziert werden konnten. Die stärkste Immunoreaktivität in den Nerven war im CCC meßbar. Hier waren zwar nicht die größten Nerven zu finden, nichtsdestotrotz konnte im Vergleich zu Nerven gesunder Lebern eine signifikante Hypertrophie nachgewiesen werden. Folglich scheint eine Zunahme der GAP-43 Immunoreaktivität mit Veränderungen in der neuralen Plastizität somit nicht nur im Pankreas, sondern auch in der Leber einherzugehen (Fink and al. 1994; Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Fink und Kollegen versuchten die Gründe für eine Zunahme der Immunoreaktivität im Pankreas zu erklären. Sie vermuteten, dass die GAP-43-Synthese entzündungsbedingt hochreguliert sei oder die Transportraten für das Molekül verändert sein könnten. Höchstwahrscheinlich ist eine Kombination aus beidem verantwortlich (Fink and al. 1994).

Die Beteiligung von GAP-43 bei der Entwicklung axonaler Wachstumskegel, konnte durch ansteigende GAP-43 Spiegel nach neuralen Schäden sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden (Fink and al. 1994). Für das Pankreas konnte zudem gezeigt werden, dass eine Zunahme der GAP-43 mRNA-Expression positiv mit der Schmerzwahrnehmung der Patienten korreliert

(Ceyhan, Demir et al. 2010). In unserer Studie konnte im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen keine signifikante Hochregulierung der GAP-43 mRNA-Expression bei den verschiedenen Entitäten nachgewiesen werden. Zwar zeigte sich tendenziell eine Zunahme dieser, die beim HCC am ausgeprägtesten war, allerdings bedarf es größerer Patientenpopulationen um eine sichere Aussage über einen Anstieg der GAP-43 Expression treffen zu können.

Expression von NGF und seinen Rezeptoren

Friess und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass pankreatische Nerven in der Lage seien aktiv zu wachsen. Eine wichtige Rolle wurde in diesem Kontext dem NGF/TrkA-Signalweg zugeschrieben (Zhu, Friess et al. 1999). So konnten Ceyhan und Kollegen zeigen, dass neben GAP-43 auch NGF, als potenter neurotropher Faktor, in Pankreaskarzinomen und umgebenen Pankreasgewebe überexprimiert ist und somit ebenfalls in Zusammenhang mit der intrapankreatischen Neuropathie steht (Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Des Weiteren konnten die Forscher belegen, dass hier die NGF-Expression sowohl mit der neuralen Hypertrophie, als auch mit der neuralen Dichte korreliert (Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Auch Friess und Kollegen gelang es, die Aktivierung des NGF/TrkA-Signalwegs im Pankreas mit Nervenwachstum in Verbindung zu bringen, wenngleich die Forscher zugaben, dass noch weitere, unbekannte Faktoren in diesem Zusammenhang eine Rolle zu spielen scheinen (Friess and Zhu 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine signifikante Veränderung der Nervendichte in der Leberzirrhose und im HCC im Vergleich zu normalem Lebergewebe nachgewiesen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine neuen Nerven einsprossen, sondern lediglich bereits vorhandene hypertrophieren. Entsprechende Untersuchungen der Expression von NGF in der Leber zeigten, dass dieses Neurotrophin in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen scheint. Sowohl die Immunoreaktivität in den Nerven als auch die relative Expression von NGF nahmen in der Leberzirrhose und im HCC ab, wohingegen das Ausmaß der neuralen Hypertrophie bei diesen Entitäten am ausgeprägtesten war. Die relative Expression von NGF sank im HCC im Vergleich zur normalen Leber sogar signifikant, obwohl bei dieser Entität die größten Nerven zu finden

waren. Die Frage, ob NGF bei den CCCs eine Rolle beim Wachstum intrahepatischer Nerven spielt, muss noch endgültig geklärt werden.

NGF bindet an die beiden Zelloberflächenrezeptoren $p75^{NTR}$ und TrkA. $p75^{NTR}$ ist ein transmembranes Glykoprotein, das alle Neurotrophine mit geringer Affinität bindet, wohingegen TrkA zu den transmembranen Tyrosinkinasen gehört und nur NGF bindet (Barbacid 1995; Barbacid 1995). Obwohl NGF als neurotropher Faktor bekannt dafür ist, dass es Zelldifferenzierung und -überleben fördert, scheint es paradoxerweise auch in der Lage zu sein, Zelltod zu induzieren. Dies hängt vermutlich vom Verhältnis der beiden Rezeptoren TrkA und $p75^{NTR}$ zueinander ab. So werden bei fehlender TrkA-Expression durch eine Bindung von NGF an $p75^{NTR}$ Signalkaskaden aktiviert, die unter Umständen zur Apoptose führen können (Barker 1998; Casaccia-Bonnel, Kong et al. 1998; Twiss, Wada et al. 1998). In dieser Arbeit zeigte sich, dass $p75^{NTR}$ unabhängig von NGF einen Einfluss auf die neurale Hypertrophie in der Leber zu haben scheint. Sowohl die relative Expression als auch die Immunoreaktivität des *low affinity*-Rezeptors $p75^{NTR}$ nehmen mit zunehmender Größe der Nerven ab, so dass sich im HCC, wo die größten Nerven lokalisiert sind, signifikant am wenigsten nachweisen ließ. TrkA scheint ähnlich wie NGF in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen. Um zu klären, inwiefern diese Beobachtung der Realität entspricht und welche Rolle eventuell vorhandenes oder nicht vorhandenes NGF dabei spielt, bedarf es weiterer Untersuchungen insbesondere auf Proteinebene. So konnte zum Beispiel für Artemin, das zur GDNF-Familie gehört und neben der Förderung von Überleben, Proliferation und Regeneration von Neuronen auch die neurale Dichte *in vitro* erhöht (Ceyhan, Schäfer et al. 2010), die Diskrepanz in der Messung auf mRNA- bzw. Proteinebene damit erklärt werden, dass Artemin eine extrapankreatische Quelle zu haben und im Pankreas zu akkumulieren scheint (Ceyhan, Giese et al. 2006).

Für das Pankreas wird angenommen, dass TrkA im Perineurium von pankreatischen Nerven mit NGF interagiert und so eine wichtige Rolle beim Wachstum und bei der Reparatur dieser Nerven spielt (Friess and Zhu 1999). Bei Patienten mit chronischer Pankreatitis konnte folglich eine Überexpression von NGF nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte mittels Immunhistochemie, insbesondere in vergrößerten Nerven, intrapankreatischen Ganglien, metaplastischen Gangzellen und degenerierten Azinuszellen (Ceyhan, Demir et al.

2010). Zhu und Kollegen zeigten, dass NGF, freigesetzt von Pankreaskarzinomzellen, parakrine Effekte auf TrkA-Rezeptoren im Perineurium von intrapankreatischen Nerven auszuüben scheint und somit deren Wachstum und perineurale Invasion beeinflusst (Zhu, Friess et al. 1999). Auch dieses Ergebnis lässt sich nicht ohne weiteres auf die Leber übertragen. So zeigte die Immunoreaktivität von TrkA in den Nerven keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Entitäten. Des Weiteren zeigten die intrahepatischen Nerven keine spezifische Färbung des Perineuriums mit TrkA, was wir allerdings für p75^{NTR} nachweisen konnten (Abb. 22 C und D). Ebenso keinen eindeutigen Hinweis für eine Beteiligung von TrkA bei der neuralen Hypertrophie lieferten die Ergebnisse der relativen Expression dieses Rezeptors auf mRNA-Ebene. So zeigten zwar die Vergleiche der relativen Expression von HCCs mit Zirrhosen bzw. CCCs signifikante Zunahmen, aber da die deutlichste neurale Hypertrophie bei den HCCs nachgewiesen werden konnte, ließen sich diese Ergebnisse nicht miteinander in Einklang bringen.

NGF scheint neben Nerven auch neurale und nicht-neurale Tumore zu beeinflussen. Für das Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass die Expression NGF und TrkA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit einer gesteigerten Proliferation der Karzinomzellen einhergeht (Zhu, Friess et al. 2001; Zhu, Kleeff et al. 2002). Außerdem induziert NGF das Tumorzellwachstum und die Invasion humaner Prostata -, Brust -, und Lungenkrebszellen (Oelmann, Sreter et al. 1995; Geldof, De Kleijn et al. 1997; Descamps, Lebourhis et al. 1998), wohingegen es bei Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms die Proliferationsrate der Krebszellen zu hemmen scheint (Missale, Codignola et al. 1998). Obwohl die genauen Mechanismen für diese nahezu gegenteilige Wirkungsweise noch ungeklärt sind, scheinen die Rezeptoren p75^{NTR} und TrkA auch in diesem Zusammenhang eine gewichtige Rolle zu spielen (Zhu, Friess et al. 2001). Wiederum scheint hier die Verteilung der beiden Rezeptoren ausschlaggebend für Dauer und Stärke der NGF-Wirkung zu sein. Die Aufklärung des genauen Zusammenspiels zwischen p75^{NTR} und TrkA und deren Effekte ist weiterhin Ziel zahlreicher Forschungsprojekte.

Abschließend lässt sich durch den Nachweis der Beteiligung von GAP-43 an der Entstehung der neuralen Hypertrophie, insbesondere im HCC, vermuten, dass die neuralen Veränderungen in der Leber ähnlich wie beim Pankreas durch aktive

nervale Umbauprozesse bedingt sind (Fink and al. 1994; Friess and Zhu 1999; Ceyhan, Bergmann et al. 2007; Ceyhan, Bergmann et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Gründe für die Zunahme der GAP-43-Immunoreaktivität nicht geklärt werden. Hier können weiterführende Untersuchungen ansetzen. Allerdings konnte diese Dissertationsschrift zeigen, dass gegensätzlich zum Pankreas der potente Wachstumsfaktor NGF in der Leber keine Rolle bei der Entstehung der beschriebenen neuronalen Veränderungen spielt (Ceyhan, Schäfer et al. 2010). Trotzdem konnte der *low-affinity* NGF-Rezeptor p75^{NTR} mit diesen in Verbindung gebracht werden. Da dieser nicht nur NGF, sondern alle Neurotrophine mit geringer Affinität bindet (Barbacid 1995; Barbacid 1995), ist an diesem Punkt weitere Forschungsarbeit nötig, um seine Rolle abschließend zu klären. Auch im Pankreas, das in dieser Hinsicht weitaus besser untersucht ist als die Leber, sind noch nicht alle an den nervalen Veränderungen beteiligten Faktoren bekannt (Friess and Zhu 1999).

VI ZUSAMMENFASSUNG

Das autonome Nervensystem ist der unwillkürliche Teil des peripheren Nervensystems (PNS) und reguliert die Motorik von Eingeweiden, die glatte Muskulatur sowie exokrine Drüsen (Yi, la Fleur et al. 2010). Autonome Nerven, die die Leber innervieren, erreichen das Organ über den Leberhilus und verlaufen gemeinsam mit der Portalvene, der Leberarterie und dem Gallengang (McCuskey 2004). Die intrahepatische Verteilung dieser Nerven variiert in hohem Maße von Spezies zu Spezies, so haben beispielsweise Ratten und Mäuse keine oder eine nur gering ausgeprägte intralobuläre Innervation. Aus diesem Grund und weil es im Falle einer Denervation der Leber nicht zu nennenswerten Abweichungen im metabolischen Gleichgewicht des Körpers kommt, wird die Rolle der hepatischen Innervation kontrovers diskutiert (McCuskey 2004; Püschel 2004; Yi, la Fleur et al. 2010). Einige Forschungsgruppen konnten bereits in der Vergangenheit zeigen, dass es bei verschiedenen chronischen Lebererkrankungen zu bedeutenden Unterschieden in der Innervation betroffener Organe kommt. So ist im Vollbild der Leberzirrhose keine parenchymale Innervation mehr nachweisbar und auch das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) bzw. das Cholangiozelluläre Karzinom (CCC) zeigen sich selbst nicht innerviert (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993; Terada and Matsunaga 2001). Zu vergleichbaren Abweichungen von der normalen Innervation kommt es bei der chronischen Pankreatitis und dem Pankreaskarzinom. Die dazugehörigen Phänomene der neuralen Hypertrophie, der Zunahme der neuralen Dichte sowie die pankreatische Neuritis und die neurale Innervation werden unter dem Begriff der „pankreatischen Neuropathie“ zusammengefasst (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Demir et al. 2009).

Im Rahmen dieser Dissertationsschrift wurde erstmals ein Kollektiv aus 103 Patienten (22 Patienten mit normalem Lebergewebe, 23 Patienten mit Leberzirrhose, 45 Patienten mit einem HCC und 13 Patienten mit einem CCC) auf Abweichungen in der Nervenanzahl und der Größe dieser untersucht. Darüber hinaus wurden Wachstumsfaktoren, die an der Entstehung der „pankreatischen Neuropathie“ entscheidend beteiligt sind, wie das Growth-Associated-Protein (GAP-43) und der Nerve growth factor (NGF) mit seinen Rezeptoren TrkA und p75^{NTR} hinsichtlich deren Beteiligung an einer möglichen „hepatischen Neuroplastizität“ mittels Immunhistochemie und qRT-PCR untersucht.

Der Mehrgruppenvergleich zwischen den medianen Nervengrößen der verschiedenen Entitäten zeigt einen deutlich signifikanten Unterschied ($p = 0.01$). Die größten Nerven konnten im HCC nachgewiesen werden. Kein Unterschied zeigte sich hingegen in der neuronalen Dichte. Auch in der Expression von GAP-43 konnten weder immunhistochemisch noch auf mRNA-Ebene signifikante Unterschiede zwischen den Lebererkrankungen nachgewiesen werden. Eine semiquantitative Analyse ergab jedoch eine deutliche Tendenz in Richtung einer Zunahme der Immunoreaktivität, insbesondere im CCC. Ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede ließen sich für den potenten Wachstumsfaktor NGF herausarbeiten. Anders verhielt es sich bei seinem *high affinity* Rezeptor TrkA. Die Immunoreaktivität unterschied sich zwar auch hier nicht signifikant, allerdings zeigte der Mehrgruppenvergleich der relativen Expression in Lebergeweben verschiedener Entitäten eine signifikante Abweichung ($p = 0.041$). Der zweite als *low-affinity* geltende NGF – Rezeptor zeigte sowohl in der Immunoreaktivität ($p = 0.002$) als auch in der relativen Expression ($p < 0.01$) deutlich signifikante Abnahmen. Die höchste Expression konnte jeweils in normalem Lebergewebe nachgewiesen werden.

So konnte in der vorgelegten Doktorarbeit weder für GAP-43 noch für NGF eine direkte Beteiligung an der Hypertrophie intrahepatischer Nerven nachgewiesen werden. Unabhängig von der Rolle des NGF scheint dessen Rezeptor $p75^{\text{NTR}}$ allerdings eine Schlüsselrolle bei den beobachteten Veränderungen der hepatischen Nerven wahrzunehmen. So nehmen sowohl die relative Expression als auch die Immunoreaktivität mit zunehmender Nervengröße ab. TrkA scheint in diesem Zusammenhang keine Rolle zu spielen.

Abschließend lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vermuten, dass die neuronalen Veränderungen ähnlich wie beim Pankreas durch aktive nervale Umbauprozesse bedingt sind. Da $p75^{\text{NTR}}$ alle Neurotrophine mit geringer Affinität bindet, bedarf die Klärung seiner Beteiligung an der Plastizität hepatischer Nerven weiterer Forschungsarbeit.

VII SUMMARY

The autonomic nervous system is the unconscious part of the peripheral nervous system (PNS), which controls the peristalsis, smooth muscles and endocrine glands (Yi, la Fleur et al. 2010). Autonomic nerves innervating the liver attain it at the hilus and run along with the portal vein, the hepatic artery and the bile duct (McCuskey 2004). The intrahepatic distribution of these nerves varies considerably from species to species. Rats and mice, for instance, show no or hardly any distinctive intralobular innervation. Therefore and because a denervation of the liver does not induce ponderable deviations within the body's metabolic balance, the function of hepatic innervation has been the subject of great controversy (McCuskey 2004; Püschel 2004; Yi, la Fleur et al. 2010). In the past, some research teams were already able to show that various chronic liver diseases attend significant differences in the innervation of affected organs. For example, parenchymal innervation cannot be detected any more in fully developed liver cirrhosis and the hepatocellular carcinoma (HCC) as well as the cholangiocellular carcinoma (CCC) also prove to be without innervation (Lee, Ahmed et al. 1992; Scoazec and Racine 1993; Terada and Matsunaga 2001). Chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma produce comparable deviations from normal innervation. The corresponding phenomena such as neural hypertrophy, increase of neural density, pancreatic neuritis and neural innervation are subsumed under the term “pancreatic neuropathy” (Ceyhan, Bergmann et al. 2009; Ceyhan, Demir et al. 2009).

Within the framework of this dissertation, neural deviations in amount and size have been examined in a group of 103 patients (22 patients with normal liver tissue, 23 patients with liver cirrhosis, 45 patients with HCC and 13 patients with CCC) for the first time. In addition to that, growth factors contributing decisively to a development of a “pancreatic neuropathy”, like the Growth-Associated-Protein (GAP-43) and the Nerve growth factor (NGF) with its receptors TrkA and p75^{NTR} have been studied with regard to their participation in a possible “hepatic neuroplasticity” by means of immunohistochemistry and qRT-PCR.

A comparison between the various groups concerning the median nerve size of the different entities shows a significant alterations ($p = 0.01$). The largest nerves

could be detected in HCC, whereas there was no variation with regard to neural density. Similarly, in the expression of GAP-43 neither immunohistochemically nor regarding the mRNA level could significant discrepancies between the liver diseases be observed. However, a semiquantitative analysis confirmed an obvious tendency towards an increase of neural immunoreactivity, especially in CCC. An examination of the potent growth factor NGF did also not reveal any statistically important discrepancies. The result was different for its *high affinity* receptor TrkA. Although neural immunoreactivity did also not vary considerably in this area, the comparison between the different groups concerning the relative expression in liver tissues of different entities did show a significant alteration ($p = 0.041$). There was also a clearly detectable decrease of the second NGF-receptor, which is considered *low-affinity*, both in the neural immunoreactivity ($p = 0.002$) and the relative expression ($p < 0.01$). The highest expression could be found in normal liver tissue.

Thus, the present study could not prove that either GAP-43 or NGF participate directly in the hypertrophy of intrahepatic nerves. Yet regardless of NGF's role its receptor $p75^{\text{NGF}}$ seems to play a key part in the observed changes of hepatic nerves, as both the relative expression and the neural immunoreactivity decrease with increasing nerve size. TrkA does not seem to be important in this context.

In conclusion, the results of this thesis support the assumption that, similar to the pancreas, neural alterations are induced by active nerval transformation. As $p75^{\text{NRT}}$ binds all low affinity neurotrophines, its participation in the plasticity of hepatic nerves requires further research.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- Ammann, R. W. (2001). "The natural history of alcoholic chronic pancreatitis." Intern Med **40**(5): 368-375.
- Ammann, R. W. and B. Muellhaupt (1994). "Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis." Gut **35**: 552-556.
- Aravalli, R. N., E. N. K. Cressman, et al. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update." Archives of Toxicology **87**(2): 227-247.
- Barbacid, M. (1995). "Neurotrophic factors and their receptors." Current Opinion in Cell Biology **7**: 148-155.
- Barbacid, M. (1995). "Structural and functional properties of the Trk family of neurotrophin receptors." Annals of the New York Academy of Sciences **766**: 442-458.
- Barker, P. A. (1998). "p75NTR. A study in contrasts." Cell Death and Differentiation **5**: 346-356.
- Berthoud, H.-R. (2004). "Anatomy and Function of Sensory Hepatic Nerves." The Anatomical Record Part A **280**: 827-835.
- Bockman, D. E., M. Büchler, et al. (1994). "Interaction of pancreatic ductal carcinoma with nerves leads to nerve damage." Gastroenterology **107**(1): 219-230.
- Bockman, D. E., M. Buchler, et al. (1988). "Analysis of nerves in chronic pancreatitis." Gastroenterology **94**(6): 1459-1469.
- Booth, C. M. and M. C. Brown (1993). "Expression of GAP-43 mRNA in mouse spinal cord following unilateral peripheral nerve damage: is there a contralateral effect?" Eur J Neurosci **5**(12): 1663-1676.
- Braganza, J. M. (2011). "Chronic pancreatitis." The Lancet **377**(9772): 1184-1197.
- Burry, R. W., J. J. Lah, et al. (1992). "GAP-43 distribution is correlated with development of growth cones and presynaptic terminals." J Neurocytol **21**(6): 413-425.
- Casaccia-Bonnel, P., H. Kong, et al. (1998). "Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis." Cell Death and Differentiation **5**: 357-364.
- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, et al. (2009). "Pancreatic Neuropathy and Neuropathic Pain - A Comprehensive Pathomorphological Study of 546 Cases." Gastroenterology **136**: 177-186.

- Ceyhan, G. O., F. Bergmann, et al. (2007). "The neurotrophic factor artemin influences the extent of neural damage and growth in chronic pancreatitis." Gut **56**: 534-544.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2008). "Neural invasion in pancreatic cancer: A mutual tropism between neurons and cancer cells." Biochemical and Biophysical Research Communications **374**: 442-447.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2010). "Fate of nerves in chronic pancreatitis: Neural remodeling and pancreatic neuropathy." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **24**: 311-322.
- Ceyhan, G. O., I. E. Demir, et al. (2009). "Pancreatic Neuropathy Results in "Neural Remodeling" and Altered Pancreatic Innervation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer." The American Journal of Gastroenterology.
- Ceyhan, G. O., N. A. Giese, et al. (2006). "The Neurotrophic Factor Artemin Promotes Pancreatic Cancer Invasion." Annals of Surgery **244**(2): 274-281.
- Ceyhan, G. O., C. W. Michalski, et al. (2008). "Pancreatic Pain." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **22**(1): 31-44.
- Ceyhan, G. O., K.-H. Schäfer, et al. (2010). "Nerve Growth Factor and Artemin are paracrine mediators of pancreatic neuropathy in pancreatic adenocarcinoma." Annals of Surgery **251**(5): 923-931.
- Chandok, N. and K. D. S. Watt (2010). "Pain Management in the Cirrhotic Patient: The Clinical Challenge." Mayo Clin Proc **85**(5): 451-458.
- Chong, M. S., M. Fitzgerald, et al. (1992). "GAP-43 mRNA in Rat Spinal Cord and Dorsal Root Ganglia Neurons: Developmental Changes and Re-expression Following Peripheral Nerve Injury." Eur J Neurosci **4**(10): 883-895.
- Chuang, S.-C., C. La Vecchia, et al. (2009). "Liver cancer: Descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection." Cancer Letters **286**: 9-14.
- Coggeshall, R. E., M. L. Reynold, et al. (1991). "Distribution of the growth associated protein GAP-43 in the central processes of axotomized primary afferents in the adult rat spinal cord; presence of growth cone-like structures." Neurosci Lett **131**(1): 37-41.
- Curtis, R., H. J. S. Stewart, et al. (1992). "GAP-43 is Expressed by Nonmyelin-forming Schwann Cells of the Peripheral Nervous System." The Journal of Cell Biology **116**(6): 1455-1464.
- Descamps, S., X. Lebourhis, et al. (1998). "Nerve growth factor is mitogenic for cancerous but not normal human breast epithelial cells." The Journal of Biological Chemistry **273**: 16659-16662.

- DiMagno, E. P., H. A. Reber, et al. (1999). "AGA technical review on the epidemiology, diagnosis, and treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. American Gastroenterological Association." Gastroenterology **117**(6): 1464-1484.
- Dominques-Munoz, J. E. (2001). "Pancreatic exocrine insufficiency: diagnosis and treatment." Journal of Gastroenterology and Hepatology **26**(2): 12-16.
- El-Serag, H. B. (2004). "Hepatocellular Carcinoma: Recent Trends in the United States." Gastroenterology **127**: 27-34.
- El-Serag, H. B. and K. L. Rudolph (2007). "Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis." Gastroenterology **132**: 2557-2576.
- Etemad, B. and D. Whitcomb (2001). "Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments." Gastroenterology **120**: 682-707.
- Fantini, F. and O. Johansson (1992). "Expression of growth-associated protein 43 and nerve growth factor receptor in human skin: a comparative immunohistochemical investigation." J Invest Dermatol **99**(6): 734-742.
- Fink, T. and e. al. (1994). "Growth-Associated Protein-43 and Protein Gene-Product 9.5 innervation in human pancreas changes in chronic pancreatitis." Neuroscience **63**(1): 249-266.
- Forssmann, W. T. and S. Ito (1977). "Hepatocyte innervation in primates." The Journal of Cell Biology **74**(1): 299-313.
- Friedmann, L. S., et al., Eds. (2012). Handbook of liver disease. Philadelphia, PA, Elsevier/Saunders.
- Friess, H. and Z.-W. Zhu (1999). "Nerve Growth Factor and Its High-Affinity Receptor in Chronic Pancreatitis." Annals of Surgery **230**(5): 615-624.
- Geldof, A. A., M. A. De Kleijn, et al. (1997). "Nerve growth factor stimulates *in vitro* invasive capacity of DU145 human prostatic cancer cells." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **123**: 107-112.
- Gispen, W. H., H. B. Nielander, et al. (1991). "Role of the growth-associated protein B-50/GAP-43 in neuronal plasticity." Mol Neurobiol **5**(2-4): 61-85.
- Hempstead, B. L. (2002). "The many faces of p75NTR." Current Opinion in Neurobiology **12**(3): 260-267.
- Holahan, M. R., K. S. Honegger, et al. (2007). "GAP-43 gene expression regulates information storage." Learning and Memory **14**: 407-415.
- Issa, Y., D. Nummer, et al. (2009). "Enhanced L1CAM expression on pancreatic tumor endothelium mediates selective tumor cell transmigration."

Journal of Molecular Medicine **1**: 99-112.

- Kakar, S. and L. D. Ferrell (2011). Liver Pathology, Demos Medical Publishing.
- Kirchgessner, A. L. and M. D. Gershon (1990). "Innervation of the Pancreas by Neurons in the Gut." The Journal of Neuroscience **10**(5): 1626-1642.
- Kirchgessner, A. L. and J. E. Pintar (1991). "Guinea pig pancreatic ganglia: proections, transmitter content, and the type-specific localization of monoamine oxidase." Journal of Comparative Neurology **305**(4): 613-631.
- Klesse, L. J. and L. F. Parada (1999). "Trks: signal transduction and intracellular pathways." Microscopy Research and Technique **45**: 210-216.
- Kumar, Abbas, et al., Eds. (2009). Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, W. B. Saunders Company.
- Lutt, W. W. (1983). "Afferent and efferent neural roles in liver function." Progress in Neurobiology **21**: 323-348.
- Lee, F. S., A. H. Kim, et al. (2001). "The uniqueness of being a neurotrophin receptor." Current Opinion in Neurobiology **11**(3): 281-286.
- Lee, J. A., Q. Ahmed, et al. (1992). "Disappearance of hepatic parenchymal nerves in human liver cirrhosis." Gut **33**: 87-91.
- Lenz, J., P. Karasek, et al. (2011). "Clinicopathological correlations of nestin expression in surgically resectable cancer including an analysis of perineural invasion." Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases **20**(4): 389-396.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." Science **237**(4819): 1154-1162.
- Li, D., K. Xie, et al. (2004). "Pancreatic cancer." The Lancet **363**(9414): 1049-1057.
- McCuskey, R. S. (2004). "Anatomy of Efferent Hepatic Nerves." Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol **280**(1): 821-826.
- Meakin, S. O. and E. M. Shooter (1992). "The nerve growth factor familiy of receptors." Trends in Neurosciences **15**(9): 323-331.
- Michelli, M. L. (2011). Liver Cirrhosis: Causes, Diagnosis, and Treatmant, Nova Science Publishers.
- Missale, C., A. Codignola, et al. (1998). "Nerve growth factor abrogates the tumorigenicity of human small cell lung cancer cell lines." Proceedings of the National Acadamy of Sciences **95**: 5366-5371.
- Miyazawa, Y., Y. Fukuda, et al. (1988). "Immunohistochemical studies on the distribution of nerve fibers in chronic liver diseases." American Journal of

Gastroenterology **83**(10): 1108-1114.

- Oelmann, E., L. Sreter, et al. (1995). "Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling." Cancer Research **55**: 2212-2219.
- Okuda, H. (2007). "Hepatocellular carcinoma development in cirrhosis." Best Practice & Research Clinical Gastroenterology **21**(1): 161-173.
- Oliveri, R. S., J. Wetterslev, et al. (2011). "Transarterial (chemo)embolisation for unresectable hepatocellular carcinoma." Cochrane Database Syst Rev **3**.
- Palmer, W. C. and T. Patel (2012). "Are common factors involved in the pathogenesis of primary liver cancers? A meta-analysis of risk factors for intrahepatic cholangiocarcinoma." Journal of Hepatology **57**: 69-76.
- Pezzilli, R., A. M. Morselli Labate, et al. (2005). "Quality of life in patients with chronic pancreatitis." Digestive and Liver Disease **37**(3): 181-189.
- Poulsen, J., P. Delikaris, et al. (1983). "Impaired pancreatic innervation after pyloric transection in dogs. Reduced pancreatic polypeptide response to insulin hypoglycaemia." Scandinavian Journal of Gastroenterology **18**(1): 17-22.
- Püschel, G. P. (2004). "Control of Hepatocyte Metabolism by Sympathetic and Parasympathetic Hepatic Nerves." The Anatomical Record Part A **280**: 854-867.
- Rodriguez-Diaz, R., M. H. Abdulreda, et al. (2011). "Autonomic axons in the human endocrine pancreas show unique innervation patterns." Cell Metabolism **14**(1): 45-54.
- Salvioli, B., M. Bovara, et al. (2002). "Neurology and Neuropathology of the Pancreatic Innervation." Journal of the Pancreas **3**(2): 26-33.
- Schaechter, J. D. and L. I. Benowitz (1993). "Activation of protein kinase C by arachidonic acid selectively enhances the phosphorylation of GAP-43 in nerve terminal membranes." Journal of Neuroscience **13**(10): 4361-4371.
- Schoppmeyer, K. and J. Mössner (2003). "Esophagus, stomach, liver, pancreas carcinoma. What recommendations for prevention?" MMW-Fortschritte der Medizin **145**(16): 30-33.
- Scoazec, J. Y. and L. Racine (1993). "Parenchymal innervation of normal and cirrhotic human liver: a light and electron microscopic study using monoclonal antibodies against the neural cell-adhesion molecule." The Journal of Histochemistry and Cytochemistry **41**(6): 899-908.
- Sharkey, K. A., P. J. Coggins, et al. (1990). "Distribution of growth-associated protein, B-50 (GAP-43) in the mammalian enteric nervous system."

Neuroscience **38**(1): 13-20.

- Sofroniew, M. V., C. L. Howe, et al. (2001). "Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair." Annual Review of Neuroscience **24**: 1217-1281.
- Stewart, H. J., T. Cowen, et al. (1992). "GAP-43 immunoreactivity is widespread in the autonomic neurons and sensory neurons of the rat.." Neuroscience **47**(3): 673-684.
- Takamido, S., Y. Kataoka, et al. (2006). "Intrapancreatic axonal hyperbranching of dorsal root ganglia neurons in chronic pancreatitis model rats and its relation to pancreatic pain." Pancreas **33**(3): 268-279.
- Terada, T. and Y. Matsunaga (2001). "S-100-positive nerve fibers in hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: An immunohistochemical study." Pathology International **51**: 89-93.
- Tharakan, T., A. L. Kirchgessner, et al. (1995). "Appearance of neuropeptides and NADPH-diaphorase during development of the enteropancreatic innervation." Brain Res Dev Brain Res **84**(1): 26-38.
- Tiscornia, O. M. (1977). "The neural control of exocrine and endocrine pancreas." The American Journal of Gastroenterology **67**(6): 541-560.
- Twiss, J. L., H. G. Wada, et al. (1998). "Duration and magnitude of nerve growth factor signaling depend on the ratio of p75LNTR to TrkA." Journal of Neuroscience Research **51**: 442-453.
- Uomo, G. and G. Manes (2007). "Risk factors of chronic pancreatitis." Digestive Diseases and Sciences **25**(3): 282-284.
- Van Lookeren Campagne, M., C. G. Dotti, et al. (1992). "B-50/GAP43 localization in polarized hippocampal neurons in vitro: an ultrastructural quantitative study." Neuroscience **50**(1): 35-52.
- Verhaagen, J., C. A. Greer, et al. (1990). "B-50/GAP43 Gene Expression in the Rat Olfactory System During Postnatal Development and Aging." Eur J Neurosci **2**(5): 397-407.
- Vincent, A., J. Herman, et al. (2011). "Pancreatic cancer." The Lancet **378**(9791): 607-620.
- Yi, C.-X., S. E. la Fleur, et al. (2010). "The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism." Biochimica et Biophysica Acta **1802**: 416-431.
- Yoon, S. O., P. Casaccia-Bonnet, et al. (1998). "Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival." J Neurosci **18**(9): 3273-3281.

- Zhu, Z.-W., H. Friess, et al. (2001). "Nerve Growth Factor Exerts Differential Effects on the Growth of Human Pancreatic Cancer Cells." Clinical Cancer Research **7**: 105-112.
- Zhu, Z., H. Friess, et al. (1999). "Nerve Growth Factor Expression Correlates With Perineural Invasion and Pain in Human Pancreatic Cancer." Journal of Clinical Oncology **17**(8): 2419-2428.
- Zhu, Z., J. Kleeff, et al. (2002). "Nerve growth factor and enhancement of proliferation, invasion, and tumorigenicity of pancreatic cancer cells." Molecular Carcinogenesis **35**: 138-147.

IX ANHANG

1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: COMPUTERGESTÜTZTE AUSWERTUNG (IMAGEJ) DER NERVENFLÄCHE.....	33
ABBILDUNG 2: COMPUTERGESTÜTZTE AUSWERTUNG (IMAGEJ) DER GEWEBEFLÄCHE	34
ABBILDUNG 3: COMPUTERGESTÜTZTE AUSWERTUNG (IMAGEJ) DER IMMUNOREAKTIVEN FLÄCHE	35
ABBILDUNG 4: SCHMELZKURVE	43
ABBILDUNG 5: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN DER MIT ANTI-PGP9.5 GEFÄRBTEN LEBERGEWEBE.	45
ABBILDUNG 6: EINGESCANNTA GEWEBESCHNITTE DER MIT ANTI-PGP9.5 GEFÄRBTEN LEBERGEWEBE	45
ABBILDUNG 7: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON MIT ANTI-PGP9.5 GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE.	46
ABBILDUNG 8: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON MIT ANTI-PGP9.5 GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE	47
ABBILDUNG 9: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER NEURALEN HYPERTROPHIE BEI UNTERSCHIEDLICHEN LEBERERKRANKUNGEN.	48
ABBILDUNG 10: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER NEURALEN DICHTS BEI UNTERSCHIEDLICHEN LEBERERKRANKUNGEN.	49
ABBILDUNG 11: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MIT ANTI-GAP-43 GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE	50
ABBILDUNG 12: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER IMMUNOREAKTIVITÄT VON GAP-43	51
ABBILDUNG 13: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN EXPRESSION VON GAP-43	52
ABBILDUNG 14: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MIT ANTI- NGF GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE	53
ABBILDUNG 15: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHME VON MIT ANTI-NGF GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE	53
ABBILDUNG 16: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES AUSMAßES DER IMMUNOREAKTIVITÄT IN DEN NERVEN VON NGF BEI VERSCHIEDENEN LEBERERKRANKUNGEN.	54
ABBILDUNG 17: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN EXPRESSION VON NGF BEI VERSCHIEDENEN LEBERERKRANKUNGEN	55
ABBILDUNG 18: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MIT ANTI-TRKA GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE	56
ABBILDUNG 19: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MIT ANTI-TRKA GEFÄRBTEM LEBERGEWEBE	56
ABBILDUNG 20: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER IMMUNOREAKTIVITÄT VON TRKA IN DEN NERVEN BEI VERSCHIEDENEN LEBERERKRANKUNGEN	57

ABBILDUNG 21: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN EXPRESSION VON TRKA BEI	
VERSCHIEDENEN LEBERERKRANKUNGEN.....	58
ABBILDUNG 22: LICHTMIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN VON MIT ANTI-P75^{NTR} GEFÄRBTEN	
LEBERGEWEBE	59
ABBILDUNG 23: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER IMMUNOREAKTIVITÄT VON P75^{NTR} IN DEN	
NERVEN BEI VERSCHIEDENEN LEBERERKRANKUNGEN.	60
ABBILDUNG 24: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN EXPRESSION VON P75^{NTR} BEI	
VERSCHIEDENEN LEBERERKRANKUNGEN.....	61

2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: HCCS: PRÄVALENZ DER EINZELNEN TUMORSTADIEN IM PRÄOPERATIVEN STAGING..	27
TABELLE 2: CCCS: PRÄVALENZ DER EINZELNEN TUMORSTADIEN IM PRÄOPERATIVEN STAGING. .	28
TABELLE 3: DNASE-VERDAU	37
TABELLE 4: MASTERMIX	38
TABELLE 5: MASTERMIX	39
TABELLE 6: MASTERMIX	41
TABELLE 7: SEMIQUANTITATIVE ANALYSE DER IMMUNOREAKTIVITÄT IN DEN NERVEN	61
TABELLE 8: ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSE NACH SPEARMAN (IMMUNOREAKTIVITÄT IN DER GESUNDEN LEBER)	62
TABELLE 9: ERGEBNISSE DER KORREALATIONSANLYSE NACH SPEARMAN (IMMUNOREAKTIVITÄT IN DER LEBERZIRRRHOSE)	62
TABELLE 10: ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSE NACH SPEARMAN (IMMUNOREAKTIVITÄT IM HCC)	63
TABELLE 11: ERGEBNISSE DER KORRELATIONSANALYSE NACH SPEARMAN (IMMUNOREAKTIVITÄT IM CCC)	63
TABELLE 12: LÖSUNGEN UND PUFFER	91
TABELLE 13: ANTIKÖRPER	93

3 Materialien

3.1 Apparaturen

- Autoklav (Systec VX-75; Systec GmbH; Wettenberg, Deutschland
- BZ-9000 Fluoreszenz-Mikroskop (Keyence Deutschland GmbH; Neu-

Isenburg, Deutschland)

- Eismaschine (Scotsman AF 100; Scotsman Ice; Italy)
- Freezer (Hera freeze; Thermo Scientific Typ B12; Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Geldokumentationssystem (GenoSmart, VWR; Ismaning, Deutschland)
- Gelelektrophoresekammer (Compact M Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus, Biometra; Göttingen, Deutschland)
- Gewebeaufschluss (TissueLyser LT Adapter 12 Tube; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland)
- Gewebeaufschluss (TissueLyser LT; Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland)
- Gewebeinfiltration (Leica ASP 200S; Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland)
- Kühlplatte (COP 30; Medite GmbH; Burgdorf, Deutschland)
- Kühlschrank (Liebherr; Biberach, Deutschland)
- LightCycler (LightCycler® 480 Real-Time PCR System; Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim, Deutschland)
- Magnetrührer (Yellow line MSH basic; IKA-Werke GmbH und Co. KG; Staufen, Deutschland)
- Mikerotom (Leica RM2255; Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland)
- Mikroskop (Axioskop 40; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Mikroskop (Zeiss Primo Vert; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Mikroskop-Kamera (AxioCam ICo3; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland)
- Paraffinausgießstation (Leica EG 1160; Leica Microsystems GmbH; Wetzlar, Deutschland)
- Pipetten (Eppendorf Research; 1000 µl; 200 µl; 100 µl; 20 µl; 10 µl; 2,5 µl; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

- Pipettierhilfe (Pipet Boy acu; Integra Biosciences AG; Zizers, Schweiz)
- Reinstwasser (Milli-Q-Advantage 10; Millipore-Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland)
- Scanner (Nikon LS-5000 ED; Nikon GmbH; Düsseldorf, Deutschland)
- Shaker (IKA® Schüttler MTS4; IKA-Werke GmbH und Co. KG; Staufen, Deutschland)
- Spectrophotometer (NanoDrop 2000 Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Thermomixer (Thermomixer Comfort; Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Vortexer (Vortex-T Genie 2; Scientific Industries; USA)
- Waage (Kern PCB; Kern und Sohn GmbH; Bahingen, Deutschland)
- Zentrifuge (Centrifuge 5424R Eppendorf; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5810 R; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

3.2 Verbrauchsmaterial

- Dako Pen (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Handschuhe (Powder-Free semper-care by sempermed; Semperit Technische Produkte GmbH; Wien, Österreich)
- Handschuhe (semper-care nitrile; Semperit Technische Produkte GmbH; Wien, Österreich)
- Klebefolie (Adhäsions-PCR-Folie, stark klebend; Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland)
- Objektträger (Menzel Gläser Super Frost Ultra Plus®; Menzel GmbH & Co KG; Braunschweig, Deutschland)
- Parafilm (Laboratory Film 4 IN. X 125 FT. Roll; Parafilm; USA)

- Pipetten (Cellstar; 5 ml in 1/10 ml; 10 ml in 1/10 ml; 25 ml in 2/10 ml; Greiner bio-one; USA)
- Pipettenspitzen (Star Lab Tip One; 1000 µl Filter Tip; 200 µl Graduated Filter Tip; 100 µl Bevelled Filter Tip; 20 µl Bevelled Filter Tip; 10 µl XL Graduated Filter Tip; STARLAB GmbH; Hamburg, Deutschland)
- QIAshredder 50 (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland)
- Reagenzröhrchen (Falcon-Röhrchen; Ratiolab GmbH; Dreieich, Deutschland)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland)
- RT-PCR Platte (96-well microplate, LightCycler-type, White; STARLAB GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Skalpell (Feather disposable scalpel No. 10; pfm medical AG; Köln, Deutschland)
- Tubes (Mikro-Schraubröhre 1.5 ml; Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland)
- Tubes (PCR Tube Strips 0.2 ml; Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland)
- Tubes (Safe Seal Reagiergefäße 2.0 ml; Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland)
- Tubes (Safe-Lock Tube 2.0 ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

3.3 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH; München, Deutschland)
- 2-Propanol (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Agarose, (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Boric Acid (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)

- Boric acid (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Dako Envision + system HRP Labelled Polymer, Anti-Mouse, 15 ml (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Dako Envision + system HRP Labelled Polymer, Anti-Rabbit, 15 ml (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)
- Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)
- dNTPs (10mM) (Promega; Madison, USA)
- Dulbecco's PBS (1x), 500 ml (PAA-Laboratories; Pasching, Österreich)
- Eosin; Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (70%; 90%; 96%); Apotheke Klinikum Rechts der Isar; München, Deutschland
- Ethanol absolute for analysis (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland)
- Ethidium bromide, (Q-Biogene; Irvine, USA)
- Ethylendiamin-tetraessigsäure/EDTA (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- GoTaq DNA Polymerase (Promega; Madison, USA)
- GoTaq Flexi Buffer (Promega; Madison, USA)
- Hämatoxylin (Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland)
- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (applied biosystems; USA)
- Light Cycler® 480 SYBR Green 1 Master (Roche Deutschland Holding GmbH; Mannheim, Deutschland)
- LightCycler® 480 SYBR Green 1 Master (Roche Applied Science; Mannheim, Deutschland)
- MgCl₂ (25mM) (Promega; Madison, USA)
- Natriumchlorid (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)

- Normal Goat Serum 10% ready to use, 100 ml (Invitrogen; USA)
- Nuclease-Free Water, 50 ml (Ambion; USA)
- Paraffin (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung) 8% 1000 ml; Apotheke Klinikum Rechts der Isar; München, Deutschland
- RNase Zap (Ambion; USA)
- RNase-free water, 10 ml (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland)
- RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen GmbH; Hilden, Deutschland)
- Roticlear (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Roti-Mount (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- RQ1 DNase Buffer 10x Reaction Buffer, 1ml (Promega; Madison, USA)
- RQ1 DNase Stop Solution, 1 ml (Promega; Madison, USA)
- RQ1 RNase free DNase, 1000u, 1 u/μl (Promega; Madison, USA)
- Trichlormethan/Chloroform (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Triton X 100, 250 ml (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Trizma® Base (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)
- Tween 20 (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Vectastain® ABC Kit (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA)
- Wasserstoffperoxid 30%, 1000 ml (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)
- Zitronensäure Monohydrat (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 12: Lösungen und Puffer

10x TBS (Tris-Buffered-Saline)	24.22 g Trizma® Base 87.66 g NaCl Ad 1l Reinstwasser
1x TBST	100 ml 10x TBS 900 ml Reinstwasser 1 ml Tween 20
4 % Paraformaldehyd-Lösung	500 ml 8 % Paraformaldehyd-Lösung 500 ml Dulbecco's PBS (1x)
0.5 % Triton X 100	5 ml Triton X 100 Ad 1000 ml Dulbecco's PBS (1x)
Wasserstoffperoxid 3 %	20 ml Wasserstoffperoxid 30% 180 ml destilliertes H ₂ O
20x Citratpuffer	21.0 g Zitronensäure Monohydrat 500 ml Reinstwasser (pH 6)
25x TBE	302.75 g Trizma® Base 137.57 g Boric Acid 0.3 g EDTA Ad 1000 ml Reinstwasser

3.4 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich GmbH hergestellt. Die Sequenzen lauteten wie folgt:

GAP-43

forward

5'-ACGACCAAAAGATTGAACAAGATG

reverse

5'-TCCACGGAAGCTAGCCTGAA

NGF

forward

5'-TGTGGGTTGGGGATAAGACCA

reverse

5'-GCTGTCAACGGGATTTGGGT

TrkA

forward

5'-CGAGAGCATCCTGTACCGTAAGT

reverse

5'-TGCTTGCCGTAGGTGAAGATC

p75NTR

forward

5'-CCAGAGGGAGAAAACTCCA

reverse

5'-GGCAGGCTGCTGTAGAGG

Cyclophilin B

forward

5'-TGTGGTGTTTGGCAAAGTTC

reverse

5'-GTTTATCCCGGCTGTCTGTC

3.5 Antikörper

3.5.1 Primär-Antikörper

Tabelle 13: Antikörper

Antikörper:	In dieser Arbeit verwendete Verdünnung:
Anti-Growth Associated Protein 43 Antibody MAB347; 50µg (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)	1:2000
TrkA (14G6) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology, Inc.)	1:400
Dako N-Universal Negative Control Rabbit; 20g/l (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)	1:2000
NGF Antibody (H-20): sc-548; 200µl (Santa Cruz Biotechnology, USA)	1:100
Monoclonal Anti-Nerve Growth Factor Receptor (NGFR p75) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)	1:20.000
Polyclonal Rabbit Anti-PGP 9.5; 1,0g/l (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)	1:2000

3.5.2 Sekundär-Antikörper

- HRP anti-mouse (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)
- HRP anti-rabbit (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Deutschland)

3.6 Software

- GraphPad Prism 5; GraphPad Software
- ImageJ; National Institutes of Health
- Light Cycler 480-Software; Roche, Basel (Schweiz)
- Office Home and Student 2010; Microsoft®

X DANKSAGUNG

Besonderer Dank gilt:

Priv.-Doz. Dr. Güralp Ceyhan

Für die Betreuung dieser Dissertation

Ulrike Bourquain

Für Unterstützung in jeder Lebenslage

Dr. Steffen Teller

Für Rat und Tat

Dr. Eva Brunner

Dominique Carty

Dr. Natascha Klose

Ramona Poth

Jannik Winkler

Für arbeitsreiche, aber doch angenehme Stunden im Labor

Und insbesondere

Dr. Dr. Daniel Hartmann

Für Hilfe und Unterstützung in jedem Moment!